

Die Rolle von TRPV4 bei der endothelialen Vasoregulation und der arteriellen Hypertonie

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Biotechnologie Philipp Heinau
aus Berlin

an der Technischen Universität Berlin
Fakultät III – Prozesswissenschaften
Institut für Biotechnologie,
Fachgebiet Medizinische Biotechnologie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften, Dr.-Ing.

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. L.-G. Fleischer

Gutachter: Prof. R. Lauster

PD Dr. H. von Döhren

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 28. September 2006

Berlin 2007

D 83

*Ganze Weltalter voll Liebe
werden notwendig sein,
um den Tieren ihre Dienste und Verdienste
an uns zu vergelten.*

C. Morgenstern

Danksagung

mein besonderer Dank gilt der Deutschen Forschungsgesellschaft, welche mir ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 865 zur Verfügung gestellt und die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. Hans von Döhren für seine unermüdliche und fortwährende Bereitschaft, mich in sämtlichen Lebenslagen zu unterstützen und mir stets mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Roland Lauster, welcher stets ein offenes Ohr für die Probleme eines Doktoranden hat, für die bereitwillige Unterstützung dieser Arbeit. Ich bedanke mich sehr herzlich bei Euch, da diese Arbeit ohne Euch nicht zu Ende hätte geführt werden können!

Gleichermaßen möchte ich mich bei Frau Carola Kusch für ihr großes Verständnis und ihre Hilfe, insbesondere während der „Zeit des Exils“ in Marburg bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Wolfgang Kübler für die Aufnahme in die Physiologie nach Abbruch der Beziehungen zu Marburg und für seine Toleranz.

Inhalt

1. Einleitung	7
1.1 Endothelfunktion	7
1.2 Rolle des Endothels bei der Gefäßtonusregulation	8
1.3 Kalzium-permeable Kationenkanäle im Endothel	12
1.3.1 Speicher-operierter und kapazitiver Ca ²⁺ -Einstrom	15
1.3.2 Humorale Endothelstimulation und Ionenkanäle.....	17
1.3.4 Hämodynamische Endothelstimulation und Ionenkanäle.....	18
1.4 Endothelfunktion bei arterieller Hypertonie	20
1.5 Die TRP-Proteinfamilie	21
1.5.1 TRP-Kanäle im Endothel.....	27
1.6.2 Die TRPV-Familie	30
1.7 Zielsetzung	32
2. Material und Methoden	34
2.1 Chemikalien.....	34
2.2 Tiere.....	35
2.2.1 genetisch determinierte Hypertonie	35
2.2.2 Blutdruckmessung	35
2.2.3 Gefäße und Endothelzellen.....	36
2.2.4 Zellisolierung aortaler Endothelzellen.....	36
2.3 Patch-clamp Untersuchungen.....	37
2.3.1 Patch-clamp Konfigurationen	37
2.3.1.1 Die <i>whole-cell</i> Konfiguration (Ganzzellableitung)	38
2.3.1.2 Die <i>cell-attached</i> Konfiguration (Einzelkanalableitung).....	38
2.3.2 Stromaufzeichnung und Datenauswertung.....	39
2.3.2.1 Berechnung der Leitfähigkeit	39
2.3.2.2 Berechnung der Ionenselektivität	40
2.3.3 Versuchsablauf.....	41
2.4 Fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	43
2.5 Untersuchungen am Druckmyograph	44
2.5.1 Versuchsaufbau.....	44
2.5.2 Gefäßpräparation	45

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen.....	45
2.6.1 Die „Multiplex“ Einzelzell-RT-PCR.....	45
2.6.1.1 Durchführung.....	48
2.6.2 Primer.....	48
2.6.3 quantitative TaqMan-PCR.....	49
2.6.3.1 Quantifizierung.....	50
2.6.3.2 Sonden.....	50
2.8 Puffer und Lösungen.....	50
2.8.1 Pipettenlösungen.....	50
2.8.2 Badlösungen.....	51
2.8.3 Perfusionspuffer.....	52
3. Ergebnisse.....	53
3.1 TRPV4 Expression im nativen Endothel der Ratte.....	53
3.2 elektrophysiologische Charakterisierung von TRPV4 im Endothel der Ratte.....	54
3.2.1 Leitfähigkeit und Selektivität.....	54
3.2.2 Inhibierung durch Kanalblocker.....	55
3.2.3 Modulation des Membranpotentials nach pharmakologischer Aktivierung von TRPV4.....	58
3.3 Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration nach pharmakologischer Aktivierung von TRPV4.....	60
3.4 Funktionelle Bedeutung von TRPV4 in der Endothel-vermittelten Vasoregulation.....	62
3.4.1 Mechanosensitive Eigenschaften von TRPV4.....	63
3.4.2 TRPV4-Funktion und Expression bei genetisch determinierter Hypertonie.....	68
4. Diskussion.....	71
4.1 Endotheliale TRPV4.....	73
4.2 Veränderungen des Zellpotentials.....	74
4.3 Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$	75
4.4 Mechanosensitiver Kalziumeinstrom.....	76
4.4.1 Intrazellulärer Kalziumspeicher.....	78

4.4.2 Mechanosensitiver Kalziueinstrom an isoliert perfundierten Arterien	79
4.5 Funktionelle Bedeutung von TRPV4 für die endotheliale Vasoregulation.....	80
4.6 Mechanosensitive Ionenkanäle und arterieller Hypertonie	82
4.6.1 Verminderte TRPV4-Funktion und Expression an der Arteria carotis communis von spontan hypertensiven Ratten.....	83
Zusammenfassung	87
Summary	89
Lebenslauf	90
Literaturverzeichnis	92

1. Einleitung

1.1 Endothelfunktion

Das Endothel kleidet als einzellige Schicht das gesamte Gefäßsystem von der luminalen Seite aus und wird als das großflächigste endokrine Organ des menschlichen Körpers angesehen. Seine Gesamtoberfläche entspricht ungefähr den Ausmaßen von sechs Tennisplätzen und sein gesamtes Zellvolumen dem von fünf Herzen. Nach seiner Entdeckung im frühen 20. Jahrhundert (1928) dachte man lange Zeit, das Endothel habe lediglich eine Barrierefunktion. Die Forschungstätigkeit von Robert F. Furchtgott, Ferid Murad und Louis Ignarro brachte Ende der 70er Jahre ans Licht, dass das Endothel sehr viel weitreichende Aufgaben im Organismus erfüllt. Für die revolutionäre Entdeckung, dass Stickstoffmonoxid (NO) eine Schlüsselrolle im Herz-Kreislauf System hat, wurden die Forschungsarbeiten von Furchtgott, Murad und Ignarro 1998 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Heute gilt das Endothel als hoch spezialisiertes Zellsystem, dessen Funktion bei der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase von der Regulation des Transportes gelöster Stoffe über die Antigenpräsentation und die Regulation der Blutgerinnung bis hin zur Kontrolle des vaskulären Wachstums (Angiogenese) reicht. Die wohl wichtigste Aufgabe des Endothels ist die Modulation des Kontraktionszustandes der glatten Gefäßmuskulatur und damit die Anpassung des Gefäßtonus an die jeweiligen hämodynamischen Gegebenheiten. Dies geschieht durch die Freisetzung endokriner Substanzen auf einen chemischen oder physikalischen Stimulus hin, welche vasokonstriktiv bzw. vasodilatorisch wirksam sind. Insofern kommt dem Endothel eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutflusses des gesamten Organismus zu.

1.2 Rolle des Endothels bei der Gefäßtonusregulation

Das Endothel reguliert den Gefäßtonus durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO, EDRF), Prostazyklin (PGI₂) und des sog. *endothelium derived hyperpolarization factor* (EDHF) (Pohl, 1986). Es existieren zahlreiche physiologische Regelkreise, die der Regulation des Gefäßtonus dienen. Lokalisiert an der Grenzfläche zwischen Blut und dem extravasalen Raum fungiert das Endothel als Sensor für eine Vielzahl von Reizen, die Einfluss auf den Gefäßtonus haben. Hierzu zählen sowohl die hämodynamischen Kräfte des fließenden Blutes wie auch zirkulierende humorale Faktoren (z.B. Acetylcholin, ATP, Bradykinin).

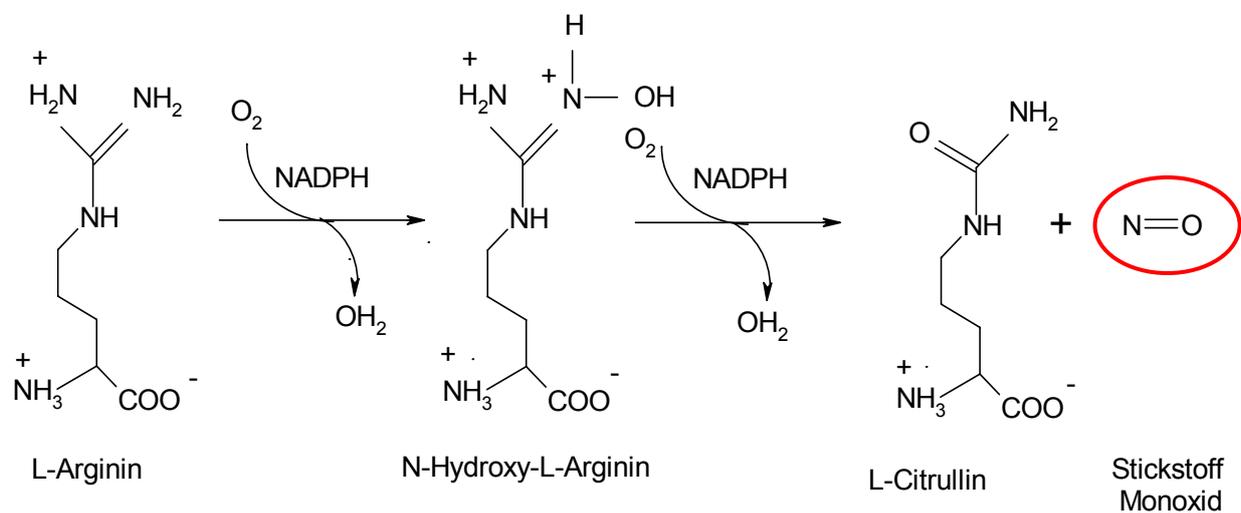


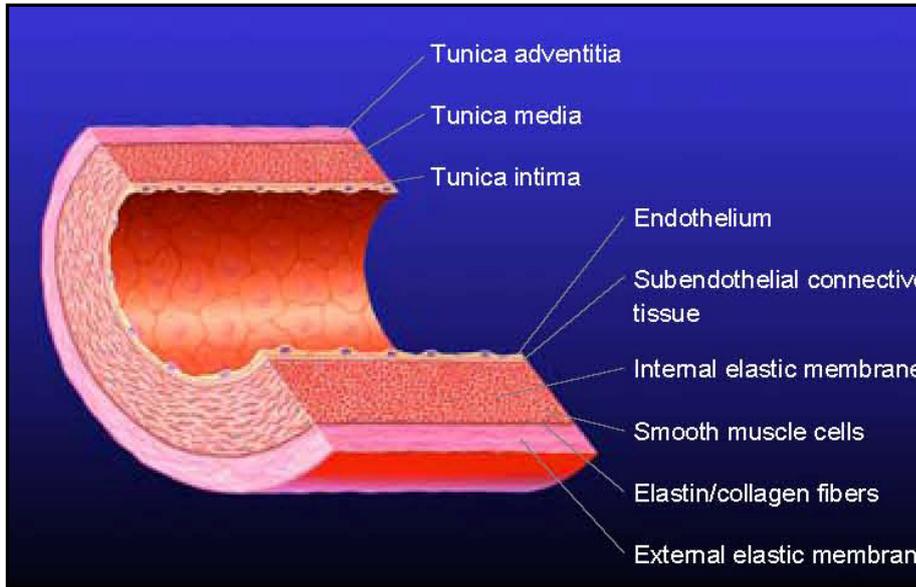
Abb 1-1.: von der NO-Synthase katalysierte Reaktion: Es erfolgt die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO unter Freisetzung von 2 Wassermolekülen.

Das Endothel vermag es, diese Reize zu detektieren und über bestimmte Signaltransduktionsmechanismen Änderungen des Blutgefäßdurchmessers zu vermitteln (Dzau, 1993; Furchgott, 1999).

Die Bildung und Freisetzung vasoaktiver Autakoide stellt zweifellos das funktionell wichtigste Prinzip der endothelialen Tonusmodulation dar. Eine intraluminale Applikation von Acetylcholin führt zu einer endothelabhängigen Hyperpolarisierung der glatten Gefäßmuskelzellen. Spannungsaktivierte Kalziumkanäle in den glatten Gefäßmuskelzellen werden so inaktiviert und es kommt zu einer Relaxierung des Gefäßes. Für die endotheliale Vasodilatation sind hier der *endothelium-derived-relaxing-factor* (EDRF), der dem Stickstoffmonoxid entspricht, Prostazyklin (PGI₂),

sowie der *endothelium-derived-hyperpolarizing-factor* (EDHF) von entscheidender Bedeutung.

NO wird mit Hilfe einer im Endothel konstitutiv exprimierten, membrangebundenen NO-Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin



gebildet. In einer komplexen Reaktion entsteht es aus einem Stickstoffatom der Aminogruppe des L-Arginins und freiem Sauerstoff NO.

Abb. 1-2: Gefäßquerschnitt der Arteria Carotis Comunis. Die im Vergleich zum Lumen relativ dicke Gefäßwand von Arterien besteht aus drei Schichten (v. innen → außen): die Tunica intima, bestehend aus dem Endothel, einer dünnen Bindegewebsschicht und der Membrana elastica interna; die Tunica media, bestehend aus alternierenden Schichten von elastischen Membranen und glatter Gefäßmuskulatur und die Tunica adventitia, bestehend aus einer elastischen Membran sowie fibrinösem bzw. lockerem Bindegewebe.

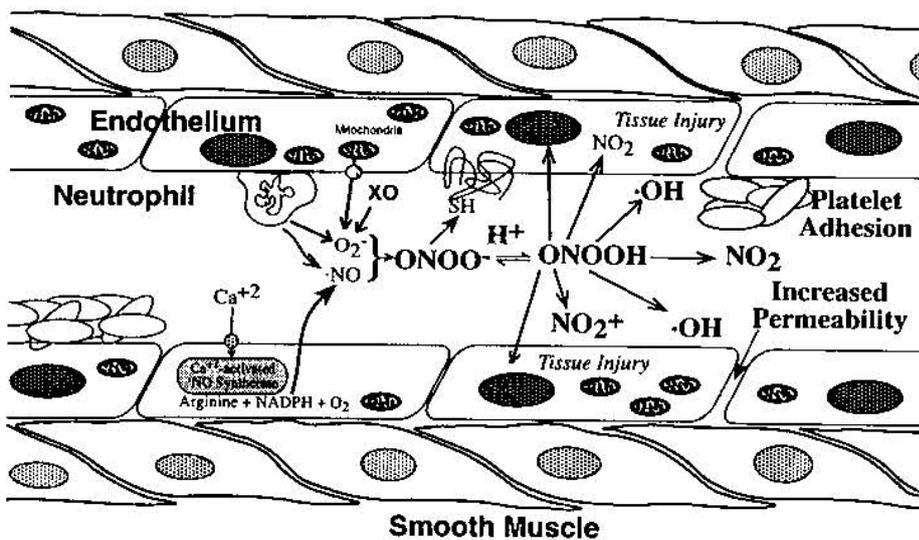


Abb.1-3: Wirkungsweise von NO im vaskulären System. Physiologische Konzentrationen von NO haben im Endothel sowohl antithrombotische als auch antiinflammatorische Wirkung. Zudem erhöht NO die Permeabilität des Endothels und erleichtert so die Leukozyteninfiltration.

Es sind drei verschiedene Isoformen der NO- Synthase bekannt. Im Endothel ist die eNOS (NOS III) wirksam. Die Aktivität der eNOS wird dabei in erster

Linie über die Konzentration des freien intrazellulären Ca^{2+} geregelt; entweder über Rezeptor vermittelte Signalkaskaden oder beispielsweise über Scherkräfte am Endothel. Die Produktion von NO durch die eNOS kann über

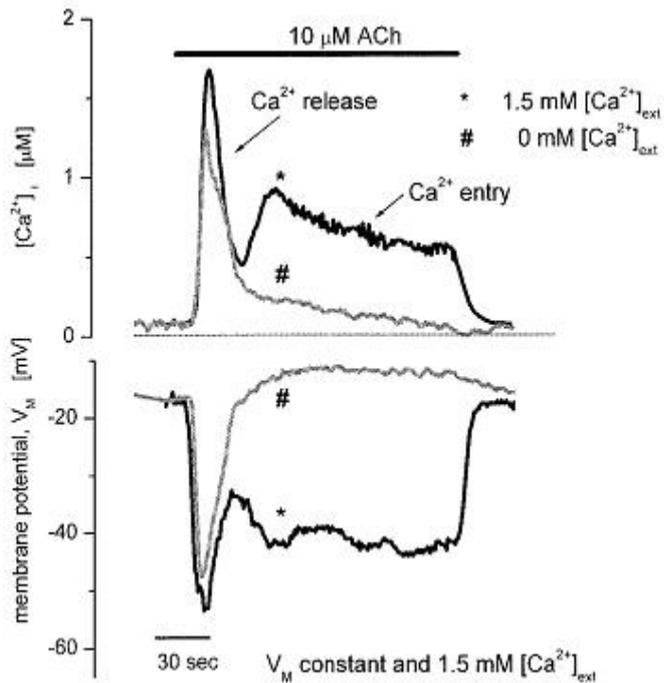


Abb. 1-4: Simultane Aufnahme des Membranpotentials und der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ einer stimulierten Endothelzelle in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_{ext}$ (aus Nilius, 1997).

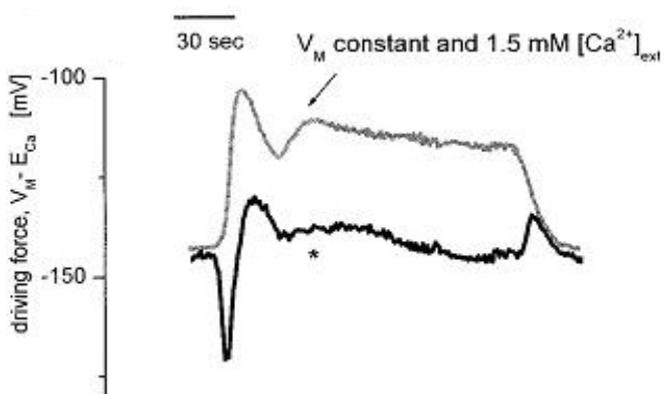


Abb. 1-5: Verlauf der „Triebkraft“ (Membranpotential $[V_m]$ – Kalziumgleichgewichtskonzentration $[E_{Ca}]$) für den Kalziumeinstrom in Abhängigkeit von der extrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_{out}$ (aus Nilius, 1997).

einen kompetitiven Mechanismus durch L-Arginin Analoga (z.B. N- ω -Mono-Methyl-L-Arginin, L-NMMA) inhibiert werden. Das führt zu Erhöhung des Blutdruckes und Verminderung des Blutflusses durch Hemmung der endothelial-vermittelten Vasodilatation.

Die relaxierende Wirkung von NO an der glatten Gefäßmuskulatur kommt über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zustande.

Die Bindung von NO an das zweiwertige Eisen der hämhaltigen Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase führt zu einer Konformationsänderung des benachbarten katalytischen Zentrums und damit zu einer Steigerung der Konversionsrate von GTP zu cGMP. Der Anstieg des intrazellulären cGMP führt zu einer Aktivierung von cGMP-

abhängigen Proteinkinasen, die wiederum die molekularen Mechanismen in Gang setzen, die über eine Absenkung des intrazellulären Kalziumspiegels zu einer Relaxation führen. Der durch NO induzierte Anstieg von cGMP

hemmt zusätzlich die Aktivierung von Thrombozyten. Endothelzellen produzieren kontinuierlich das ebenfalls an der endothelialen Vasodilatation beteiligte Prostazyklin (PGI_2). Prostazyklin wirkt über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration. Diese führt in Thrombozyten zu einer Aggregationshemmung, an glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Relaxation und somit zur Vasodilatation. Arachidonsäure (AA) ist die Ausgangssubstanz für Prostazyklin. Sie selbst ist Bestandteil der Membranphospholipide und wird durch die kalziumabhängige Phospholipase A_2 (PLA_2) aus der Zellmembran freigesetzt. In einer durch die Cyclooxygenase (COX) katalysierten Reaktion entsteht zunächst Prostaglandin- H_2 , der Vorläufer von Prostazyklin. Die Cyclooxygenase ist membrangebunden und besteht aus zwei Untereinheiten. Es sind zwei Isoformen bekannt: die COX-1, die physiologische Funktionen im gesunden Gewebe erfüllt, und die COX-2, die durch Entzündungsreize aktiviert Entzündungsmediatoren freisetzt. Durch nichtsteroidale Antirheumatika (z.B. Indomethacin) kann die Cyclooxygenase inhibiert und so die Prostazyklinproduktion verhindert werden. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf den systemischen Blutdruck; die Funktion des Prostazyklins liegt primär in der lokalen Gefäßregulation und Verhinderung von Thrombenbildung.

Die Hyperpolarisierung des Endothels durch Acetylcholin kann durch hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen und K^+ -Kanal Inhibitoren verhindert. Eine Inhibition der endothelialen NO-Synthase und Cyclooxygenase blockiert die Aktivität von Acetylcholin jedoch nicht vollständig. Daraus wurde geschlussfolgert, dass es eine weitere Substanz, nämlich den *endothelium-derived-hyperpolarization-factor* (EDHF) geben muss, die für diese Acetylcholin induzierte, nicht NO- und nicht Prostazyklin-abhängige Vasodilatation verantwortlich ist. Obwohl sich viele Forschungsprojekte intensiv mit der Identifizierung dieses EDHF beschäftigen, konnte bis jetzt noch keine einheitliche Beschreibung seiner Eigenschaften und Funktionsweise gegeben werden.

Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass EDHF in verschiedenen Gefäßgebieten und verschiedenen Spezies unterschiedliche Substanzen sein können (Beny, 1999; Feletou, 1999). Auch scheint EDHF in Arteriolen und Arterien kleineren Durchmessers eine größere Bedeutung zu haben, als in

(Brakemeier, 2003; Kohler, 2003). Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle der Zellmembran werden nach Rezeptorstimulation und in Abhängigkeit des Füllungszustandes der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher aktiviert. Ihre Aktivierung ermöglicht erstens ein Auffüllen der intrazellulären Speicher und zweitens die Plateauphase der intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung. Diese gewährleistet eine anhaltende Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Synthese- oder Transkriptionsprozessen nach humoraler Stimulation.

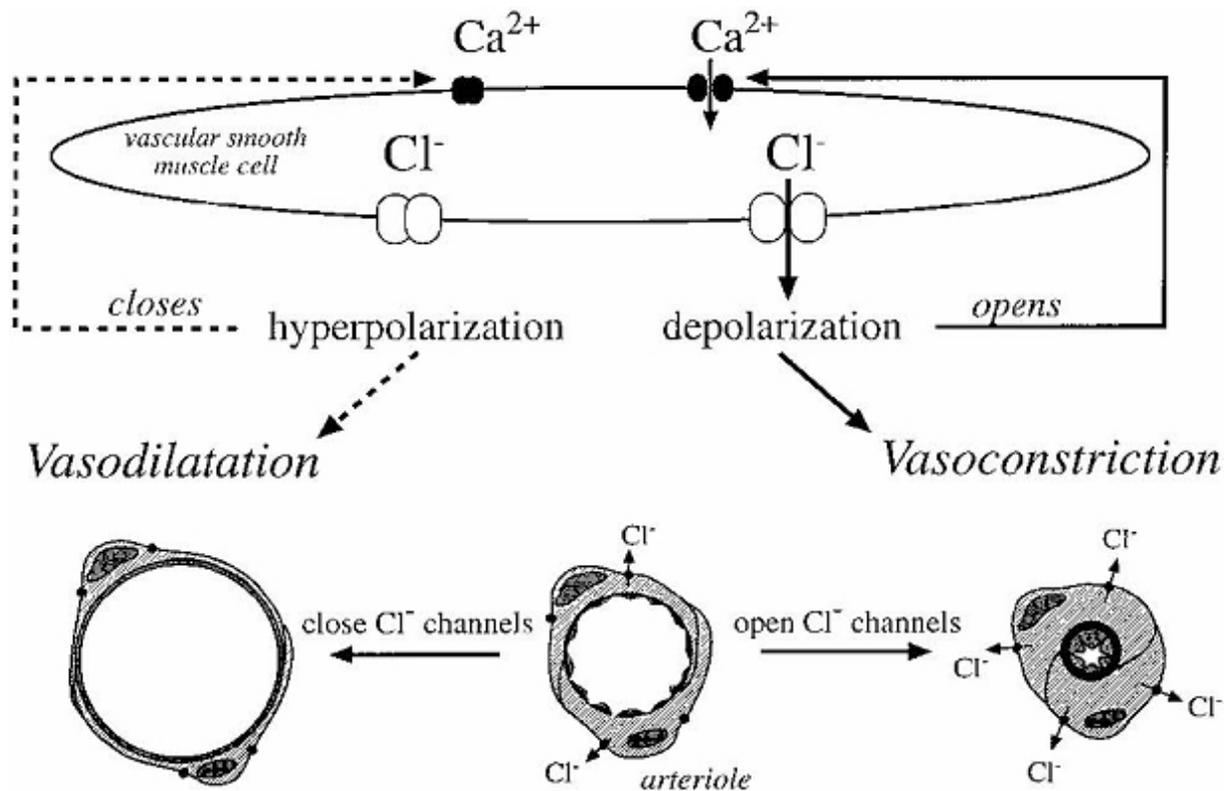


Abb. 1-7: Chloridkanäle und ihr Einfluss auf den vaskulären Tonus (aus Jackson, 2000). Die Öffnung von Chloridkanälen führt zu einer Depolarisation der glatten Gefäßmuskulatur (VSM) und infolge dessen zu einer Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Der Kalziumeinstrom bzw. die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration veranlasst die glatte Gefäßmuskulatur (VSM) zur Vasokonstriktion. Entsprechend führt die Schließung von Chloridkanälen zur Vasodilatation.

Neben Ca^{2+} -permeablen Kationenkanälen ist die Ko-Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen (K_{Ca}) nach humoraler Stimulation für den Ca^{2+} -Einstrom wichtig, da diese Kanäle einen Ladungsausgleich für den Ca^{2+} -Einstrom ermöglichen und das Endothel hyperpolarisieren können. Somit stellt die Aktivität dieser K_{Ca} die elektrische Triebkraft für den Ca^{2+} -Einstrom bereit, der sich ansonsten aufgrund seines depolarisierenden Effekts selbst limitieren würde (Kohler, 2001). In Säugerzellen wird die Genfamilie der K_{Ca}

in drei Unterfamilien unterteilt: a) K_{Ca} mit hoher (*hSlo*), b) mit intermediärer (*hIK1*) und c) mit kleiner Leitfähigkeit (*hSK1-3*). An kultivierten Endothelzellen humanen und bovinen Ursprungs wurden diese Kanalsubtypen von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Cai, 1998; Malek, 1996; Jacob, 1991; Hoyer, 1998).

Es gibt bislang einzelne indirekte Hinweise darauf, dass die Funktion der die Ca^{2+} -Homöostase regulierenden Ionenkanälen bei pathologischen Gefäßalterationen (Angiogeneseprozessen) eine Rolle spielen könnte. So scheint z.B. an kultivierten Endothelzellen eine Beteiligung von speichergesteuerten Ca^{2+} -permeablen Kanälen an endothelialen Formveränderungen bzw. an der Endothelzellproliferation vorzuliegen (Grgic, 2005; Kim, 2003; Jiang, 2001). Durch Inhibition dieser Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle konnten mit Angiogenese assoziierte morphologische Veränderungen unterdrückt werden. Bezüglich der indirekt den Ca^{2+} -Einstrom regulierenden Kaliumkanäle konnte anhand von *in vitro* Untersuchungen an kultivierten umbilikalen Endothelzellen gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) zu einer Aktivierung eines Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanals hoher Leitfähigkeit, des sog. Maxi K, führte (Kuhlmann, 2004). Die Inhibition des Kanals mittels des spezifischen Kanalblockers Iberiotoxin führte in der Zellkultur zur Inhibition der Zellproliferation.

Ob bei den Signaltransduktionsmechanismen weiterer pro-angiogenetischer Faktoren, wie z.B. VEGF, eine Aktivierung von Ionenkanälen beteiligt ist, wurde bisher nur unzureichend untersucht. Es ist darüber hinaus gänzlich unbekannt, welche den Ca^{2+} -Einstrom regulierenden Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle und Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle stimulierten Endothelzellen exprimiert werden und ob sich das Expressionsmuster dieser Kanäle im Vergleich zu nicht aktivierten Endothelzellen verändert. Ein verändertes Expressionsmuster und konsekutiv veränderte Ionenfluxe könnten wesentlich an der Steuerung von pathologischen Umbauprozessen in der Gefäßwand (Angiogeneseprozessen) beteiligt sein.

1.3.1 Speicher-operierter und kapazitiver Ca^{2+} -Einstrom

Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher mittels TG oder tBHQ führen in Endothelzellen zu einem Ins(1,4,5)₃P- Ca^{2+} -unabhängigen Kalziumeinstrom (sog. kapazitiver-Kalziumeinstrom, CCE) (Thastrup, 1990; Thastrup, 1994; Nilius, 2001). Dieser Einstrom ist scheinbar stark an den Füllungszustand der intrazellulären Kalziumspeicher gekoppelt und gilt als wichtigster Ca^{2+} -Einstrom Mechanismus nach Agonistenstimulation (Dolor, 1990; Dolor, 1992). Sich aufladende oder gefüllte Speicher verhindern einen Kalziumeinstrom, wohingegen sich entladende oder leere Speicher zu einem Kalziumeinstrom führen. Die hierfür verantwortlichen Kanäle werden als speicherregulierte Ca^{2+} -Kanäle (SOCs) beschrieben (Casteels, 1981; Putney, 1986). In der Regel gelten SOC als sehr viel Kalzium-selektiver als nicht-selektive Kalzium-permeable Kanäle. Das Modell des speicherregulierten Ca^{2+} -Einstroms beruht auf den Beobachtungen von Putney, dass die durch Bindung eines extrazellulären Liganden an einen Rezeptor ausgelöste Freisetzung von Ca^{2+} aus Ca^{2+} -Speicherorganellen zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle aus dem umgebenden Medium führt (Putney, 1986). Hierbei wurden die Zellen zunächst in Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} mit verschiedenen Liganden stimuliert, die durch Bindung an einen Rezeptor in der Plasmamembran den Austritt von Ca^{2+} aus dem ER bewirken. Durch Zusatz des Ca^{2+} -Chelators EGTA im extrazellulären Medium wurde das durch Ca^{2+} -Pumpen und -Austauscher aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum gelangende Ca^{2+} aus den Zellen entfernt. Die anschließende Zugabe von Ca^{2+} in das die Zellen umgebende Medium bewirkte in Gegenwart eines Rezeptorinaktivierenden Antagonisten einen rapiden Einstrom von Ca^{2+} in das Zellinnere und das ER der Zelle. Eine erhöhte zytosolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Zelle konnte Putney, der die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ über den Ausstrom von $^{86}\text{Rb}^+$ durch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle in der Plasmamembran gemessen hat, erst nach erneuter Zugabe von Rezeptoraktivierenden Liganden feststellen. Hieraus wurde geschlossen, dass die Aktivierung der Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran durch den Ca^{2+} -Gehalt des Speichers reguliert wird und (fälschlicherweise), dass der durch den Rezeptor ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom direkt aus dem umgebenden Medium in die

internen Speicher gelangt. Mit der Entwicklung von Fluoreszenzfarbstoffen wie Fura-2 (Grynkiewicz, 1985), mit Hilfe derer die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration direkt bestimmt werden kann (Tsien, 1985; Poenie, 1985; Luckhoff, 1990), zeigte sich jedoch bei Thapsigargin oder IP_3 -induzierter SOC-Aktivität, dass das durch die SOCs aufgenommene extrazelluläre Ca^{2+} zuerst in das Zytosol in der Zelle eintritt, um anschließend von dort aus in die intrazellulären Speicher zu gelangen. Ein sehr gut beschriebener SOC ist der so genannte *Ca²⁺-release-activated-calcium-channel* (CRAC) (Kerschbaum, 1999). Dieser hoch Kalzium-selektive Kanal ($\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} \gg \text{Mn}^{2+}$, geringe Na^+ -Leitfähigkeit) mit einer äußerst geringen Einzellkanalleitfähigkeit von 30 fS für Ca^{2+} wurde erstmals 1992 in

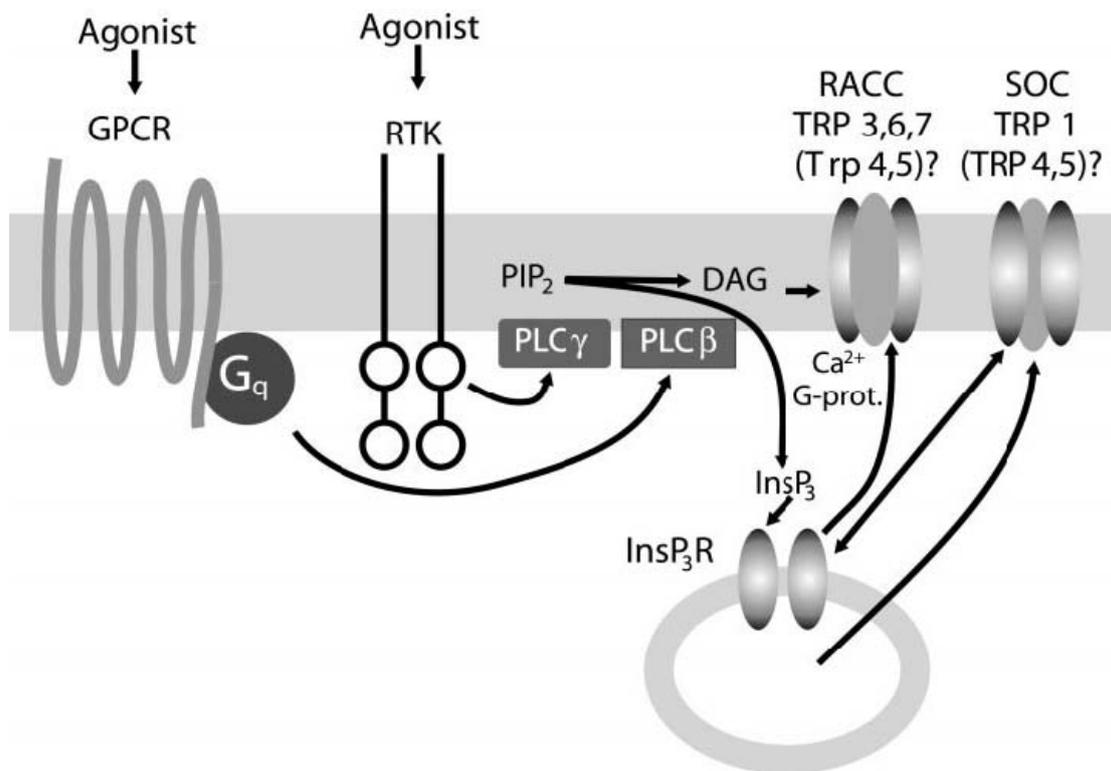


Abb. 1-8: postulierter Aktivierungsmechanismus für TRPC's (aus Nilius, 2001). Die hier gezeigte Signalkaskade beginnt mit der Bindung an einen G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR) oder an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK), welche über Aktivierung der Phospholipasen C (PLC) zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führen kann.

Endothelzellen beschrieben (Fitscha, 1992). Der von CRAC's medierte Strom (I_{CRAC}) zeigt das für hoch Ca^{2+} -selektive Kanäle typische stark positive Umkehrpotential. CRAC's zeigen eine charakteristische Strom-Spannungskurve und sind unabhängig vom Membranpotential. Zusätzlich weisen die CRACs eine positive Feedback-Schleife bezüglich der zytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]$ auf und werden durch verschiedene zwei- und dreiwertige Kationen, wie z.B.

Zn²⁺, Mn²⁺ oder La²⁺ und Gd³⁺ blockiert (Lewis, 1989; Hoth, 1992; Zweifach, 1993; Fasolato, 1994; Petersen, 1994; Zweifach, 1995; Lepple-Wienhues, 1996; Lepple-Wienhues, 1997; Parekh, 1997). Die derzeit am besten charakterisierten SOCs, die je nach Typ unterschiedliche Ca²⁺-Selektivitäten aufweisen, sind die CRACs. Der Aktivierungsmechanismus für SOC ist weitgehend unklar. Pharmakologische Erkenntnisse über SOC Ströme in EC liegen nicht vor. Generell ist die Datenlage über die dem kapazitiven Kalziumeinstrom zu Grunde liegenden Mechanismen weitgehend unklar. Es werden zahlreiche *second-messenger*-gesteuerte Prozesse in Erwägung gezogen, wie beispielsweise die Aktivierung von Tyrosinkinasen oder Phosphatasen, Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels (EET`s) oder Diazylglycerol (DAG) (Nilius, 2003). Auch eine direkte Verbindung zwischen dem InsP₃-Rezeptor und dem CRAC wird diskutiert (Semenova, 1999). Die Beteiligung von TRP Kanäle an einer direkten Verbindung wurde ebenfalls postuliert (Kiselyov, 1998; Kiselyov, 1999).

1.3.2 Humorale Endothelstimulation und Ionenkanäle

Als Folge einer Stimulation des Endothels durch humorale Faktoren wie z.B. Bradykinin, Acetylcholin, ATP oder Serotonin beobachtet man in den Endothelzellen einen biphasischen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Einem initialen *Ca²⁺-Peak*, der durch die IP₃ (*inositol(1,4,5)trisphosphat*) -vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums generiert wird (Freay, 1989; Nilius, 1997), folgt eine lang anhaltende Plateauphase der Ca²⁺-Erhöhung, die auf den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ in die Endothelzelle zurückzuführen ist (Schilling, 1989; Jacob, 1990). Diese intrazelluläre Erhöhung der Kalziumkonzentration stimuliert die endotheliale NO-Synthase und somit die Freisetzung von NO und möglicherweise des EDHF (Busse, 1988; Adams, 1989; Chen, 1990).

Zusätzlich reagiert eine humoral stimulierte Endothelzelle mit einer Zellhyperpolarisation, die auf einem Ca²⁺-aktivierten K⁺-Ausstrom über Ca²⁺-abhängige K⁺-Kanäle beruht (Colden-Stanfield, 1987 & 1990; Johns, 1987;

Fichtner, 1987; Kitamura, 1991; Kamouchi, 1997; Ikeuchi, 1995; Yamamoto, 1999). Die Zellhyperpolarisation ermöglicht aufgrund des nun erhöhten elektrochemischen Gradienten den lang anhaltenden Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zelle (Schilling, 1989; Jacob, 1990), welcher eine wichtige Voraussetzung für die Bildung und Freisetzung vasodilatierender Substanzen wie NO, PGI_2 und EDHF darstellt (Lückhoff, 1990). Hieraus kristallisiert sich die große Bedeutung der endothelialen Ca^{2+} -permeablen Kationenkanäle und Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanäle für die Synthese und Sezernierung vasoaktiver Substanzen im Endothel. Es konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden, über welche Kanäle dieser lang anhaltende Ca^{2+} -Einstrom erfolgt (Nilius, 2001). Neben IP_4 (*inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphat*)-regulierten Ca^{2+} -Kanälen (Luckhoff, 1992; Neher, 1992) werden auch mechanosensitive, nicht-selektive Kationenkanäle (Nilius, 1993; Lansman, 1987; Hoyer, 1996; Popp, 1992) und Ca^{2+} -selektive Kationenkanäle der TRP (*transient receptor potential*)-Familie (Vaca, 1994; Köhler, 2001) diskutiert.

Ergänzend kann hinzugefügt werden, dass auch eine direkte elektrische Übertragung endothelialer Hyperpolarisationen auf glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) über myoendotheliale Verbindungen, sog. *gap junctions*, beschrieben wurden (Mombouli, 1997; Yamamoto, 1999).

1.3.4 Hämodynamische Endothelstimulation und Ionenkanäle

Gesteigerte Blutflussraten gehen mit erhöhten Wandschubspannungen, sog. *shear stress*, einher, die vom Endothel registriert werden. Als Reaktion hierauf vermittelt das Endothel eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Pohl, 1986; Busse, 1985; Kuo, 1990; Nabel, 1990; Busse, 1993). Diese Fluss-induzierte Vasodilatation ist ein äußerst wichtiger Mechanismus, durch welchen die Gefäßwand vor Schädigungen durch zu hohe Scherkräfte geschützt und eine adäquate Blutversorgung der nachgeschalteten Organe und Gewebe gewährleistet wird (Hoyer, 1997; Davies, 1995; Melkumyants et al., 1994). Darüber hinaus werden durch *shear stress* die Zellproliferation und Genregulation der Endothelzelle beeinflusst (Frangos, 1985; Levesque,

1989; Diamond, 1989; Hsieh, 1991; Resnik, 1993). Während die endothelialen Signaltransduktionswege nach humoraler Stimulation in ihren Grundzügen gut charakterisiert werden konnten, ist der Signaltransduktionsmechanismus nach hämodynamischer Stimulation, der im finalen Schritt in einer erhöhten Produktion von NO und PGI₂ mündet, nur unzureichend geklärt. Analog zur Signaltransduktion nach humoraler Stimulation scheint aber auch hier die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wie auch die Aktivierung endothelialer Ionenkanäle eine zentrale Rolle zu spielen (Himmel, 1993; Hoyer, 1996; Lansman, 1987; Popp, 1992; Davies, 1995).

Mechanische Stimulationen durch gesteigerte Flussraten und intravasale Druckerhöhungen führen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in Endothelzellen (Falcone, 1993; Shen, 1992). Auch lokal und zeitlich begrenzte Konzentrationsanstiege in Form von Ca²⁺-Oszillationen werden beobachtet (Hoyer, 1998; Shen, 1992). Für die Erhöhung des Ca²⁺-Spiegels sind dabei der Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ und die Ca²⁺-induzierte Ca²⁺-Freisetzung aus Ryanodin-sensitiven Speichern von großer Relevanz (Hoyer, 1998). Unter Anwendung der *patch-clamp*-Technik konnten am Endothel mechanosensitive Ionenkanäle detektiert werden (Hoyer, 1996; Lansman, 1987; Popp, 1992), die als Mechanosensoren und somit als Anfangsglieder bei der Signaltransduktion nach Stimulation durch *shear stress* fungieren können (Davies, 1995). Eine mechanische Stimulation Ca²⁺-selektiver und Ca²⁺-permeabler mechanosensitiver Kanäle zieht einen Ca²⁺-Einstrom nach sich und führt somit zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Naruse, 1993; Himmel, 1993). Zudem hyperpolarisiert eine mechanisch stimulierte Endothelzelle (Nakache, 1988), was auf einen K⁺-Ausstrom zurückzuführen ist (Olesen, 1988). Experimente an frisch isolierten Blutgefäßen haben gezeigt, dass die Flussinduzierte Vasodilatation (Cooke, 1991) und die Bildung von NO (Hutcheson, 1994) in Abhängigkeit von der Aktivität hyperpolarisierender Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle stehen. Analog zur Signaltransduktion nach humoraler Stimulation erhöht eine Hyperpolarisation auch hier den elektrochemischen Gradienten für Ca²⁺ und ermöglicht dadurch einen weiteren Ca²⁺-Einstrom in die Endothelzelle.

Interessanterweise reicht der Ca^{2+} -Einstrom durch endotheliale mechanosensitive Ionenkanäle aus, um eng benachbarte Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle zu aktivieren. Das Zusammenspiel dieser beiden Kanaltypen begründet somit einen positiven Rückkopplungsmechanismus, der in seiner Konsequenz zu einem länger anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom in die Endothelzelle führt (Hoyer, 1994).

Ergänzend muss hinzugefügt werden, dass an isolierten, auf *in vivo* Länge gedehnten Gefäßen, die Flussinduzierte NO-Freisetzung auch unabhängig von einer Ca^{2+} -Aktivierung erfolgen kann. Hierbei scheint eine gewisse Abhängigkeit der NO-Synthese vom pH-Wert und einer Tyrosin-Phosphorylierung in den Vordergrund zu treten (Ayajiki, 1996).

1.4 Endothelfunktion bei arterieller Hypertonie

Bei experimenteller Hypertonie und bei essentieller Hypertonie wurde verschiedentlich eine endotheliale Dysfunktion beschrieben, die zur Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes bei Hypertonie beitragen könnte (Panza, 1990; Lüscher, 1990, Lüscher 1992; Dominiczack, 1995; Suzuki, 1995; Egashira, 1995; Iiyama, 1996; Vanhoutte, 1996; Kelm, 1997). Die endotheliale Dysfunktion kann einerseits zu einer verminderten Freisetzung vasodilatierender Substanzen wie NO (Linder, 1990; Panza, 1993; Forte, 1997) führen. Andererseits kann es zu einer gesteigerten Freisetzung vasokonstriktiv wirkender Substanzen wie Prostaglandin H_2 (Taddei, 1993; Kung, 1995) oder von Sauerstoffradikalen, welche NO neutralisieren können (Tschudi, 1996), kommen. Ein wichtiger Teil der endothelialen Dysfunktion betrifft die fluss- oder *shear stress*-induzierte Vasodilatation. So konnte an isolierten Arteriolen der Skelettmuskulatur gezeigt werden, dass die *shear stress*-induzierte Vasodilatation bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Vergleich zu normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) vermindert ist (Koller, 1994 & 1995). Bei Patienten mit essentieller Hypertonie war die Fluss-induzierte Vasodilatation der Koronargefäße im Vergleich zu normotensiven Patienten geschädigt (Antony, 1995 & 1996).

Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Bedeutung des Endothels bei der arteriellen Hypertonie auch kontrovers diskutiert wird (van Zwieten, 1995), da in einigen Studien eine normale Funktion des Endothels bei experimenteller Hypertonie (Angus, 1992; Li, 1993) und bei hypertensiven Patienten nachgewiesen wurde (Cockcroft et al., 1996). Die große Mehrzahl der Untersuchungen weist aber auf eine endotheliale Dysfunktion bei Hypertonie hin.

Ionenkanäle des Endothels wurden bisher nicht vergleichend bei Hypertonie untersucht. Da aber die Fluss-induzierte Vasodilatation endothelabhängig ist und Ionenkanäle wichtige Regulatoren der Endothelfunktion sind, erscheint es wichtig, bei Hypertonie die Funktion von Ionenkanälen zu untersuchen.

1.5 Die TRP-Proteinfamilie

TRP-Kanäle wurden erstmals in Photorezeptorzellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Während Photostimulation in Rezeptorzellen des Wildtyps eine lang anhaltende Phase der Zelldepolarisation herbeiführte, trat diese nach Basendeletion in der sogenannten dTRP-Mutante nur transient auf. Die rapide Repolarisation des Photorezeptorpotentials hatte den kompletten Verlust des Sehvermögens in den betreffenden Individuen zur Folge (Cosens, 1969, Pak, 1970). Da die Depolarisation der Photorezeptorzellen mit einer erhöhten Kalziumpermeabilität der Zellmembran einherging, schlugen Hardie und Minke (1992) die Beteiligung der TRP-Proteine als Komponente für einen Ca^{2+} -Einstromkanal vor. Nachdem die Sequenzen von dTRP sowie des Homologs TRPL (TRP-like) bestimmt waren (Montell, 1989), wurden Homologien zu den Sequenzen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen deutlich (Phillips, 1992). Klonierung von TRP und TRPL in Sf9 Zellen führten zu einer PLC-abhängigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Harteneck, 1995; Hu, 1995). Da die Transfektion mit einem erhöhten Kalziumeinstrom nach Speicherentleerung mit Thapsigargin einherging (Peterson, 1995; Vaca, 1994) wurde vermutet, dass TRP-Kanäle am kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom (*capacitative calcium entry* - CCE) beteiligt

sind und als speicheroperierte Kalziumkanäle (*store operated cationic channels* - SOCC) fungieren können. Heute zählen 26 der 28 bekannten TRP-Kanäle zur Gruppe der nicht-selektiven Kationenkanäle (*non-selective channels* - NSC). Diese sind innerhalb vieler Spezies identifiziert worden und zeichnen sich durch eine niedrige Selektivität für ein bestimmtes Kation aus, d.h. sie sind oftmals permeable für verschiedene Ionen unterschiedlicher Valenz. Die ersten Säuger-TRP-Gene wurden

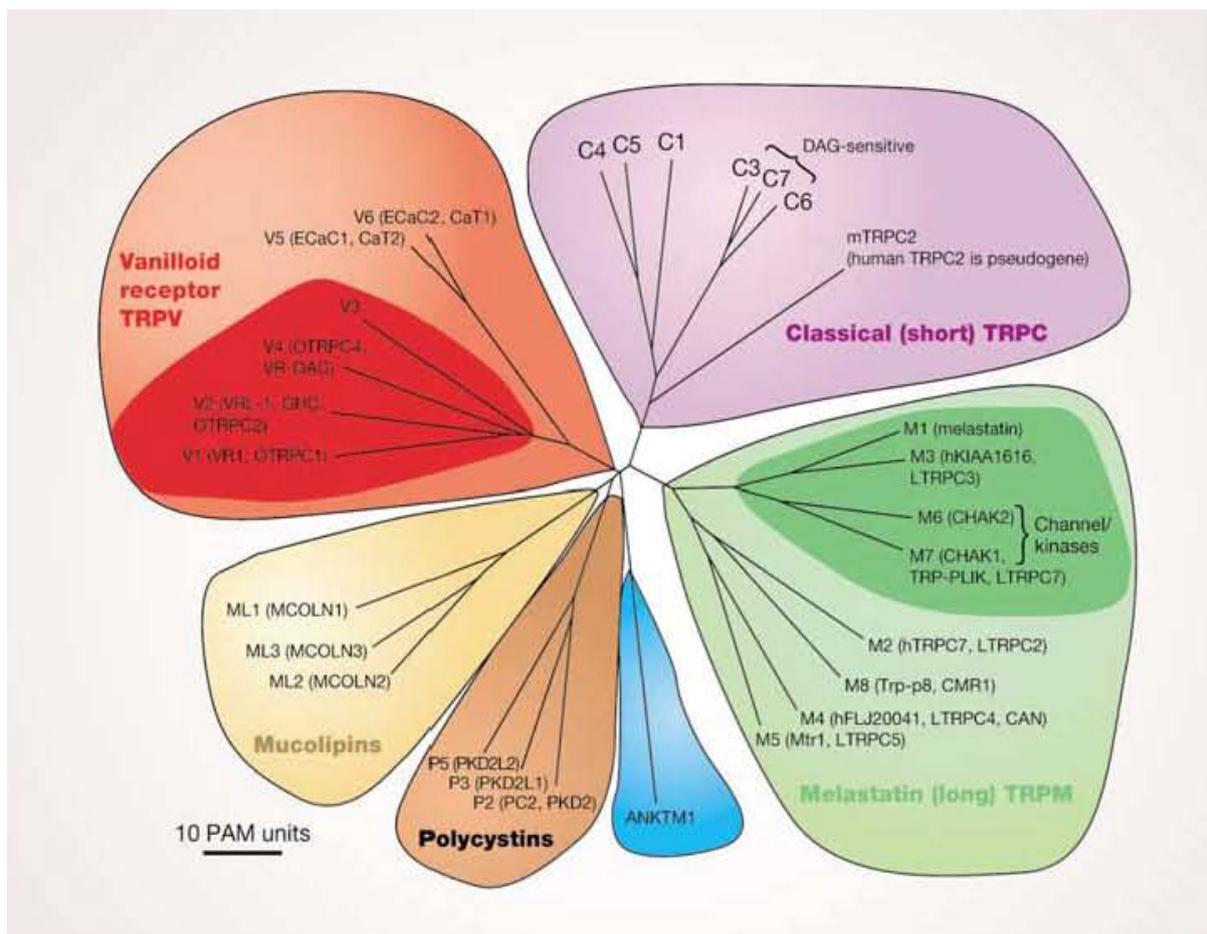


Abb. 1-9: Stammbaum der bislang in Vertebraten detektierten TRP-Proteine [PAM = Point Accepted Mutations] (aus Clapham, 2003). Die uneinheitliche Nomenklatur ist auf die simultane Klonierung von TRP-Proteinen in verschiedenen Arbeitsgruppen zurückzuführen. Den drei großen Unterfamilien TRPC (cononical), TRPV (vanilloid) und TRPM (melastatin) stehen die drei kleinen Unterfamilien TRPML (mucolipins), TRPP (polycystic kidney disease – associated) und das bislang einzige Mitglied der TRPA-Familie ANKTM1 gegenüber.

gleichzeitig in zwei verschiedenen Laboratorien kloniert und publiziert, wodurch zwei verschiedene Nomenklaturen eingeführt wurden (Zhu, 1995; Wes, 1995). Es wurden hTRPC1 (hTRP1) sowie partielle Sequenzen von hTRPC2 (hTRP2) und hTRPC3 (hTRP3) publiziert, wobei hTRPC2 (hTRP2) ein

Pseudogen zu sein scheint. Die Klonierung der vollständigen hTRPC3-cDNA-Sequenz und dessen Expression (sowie die von hTRPC1) und die Klonierung

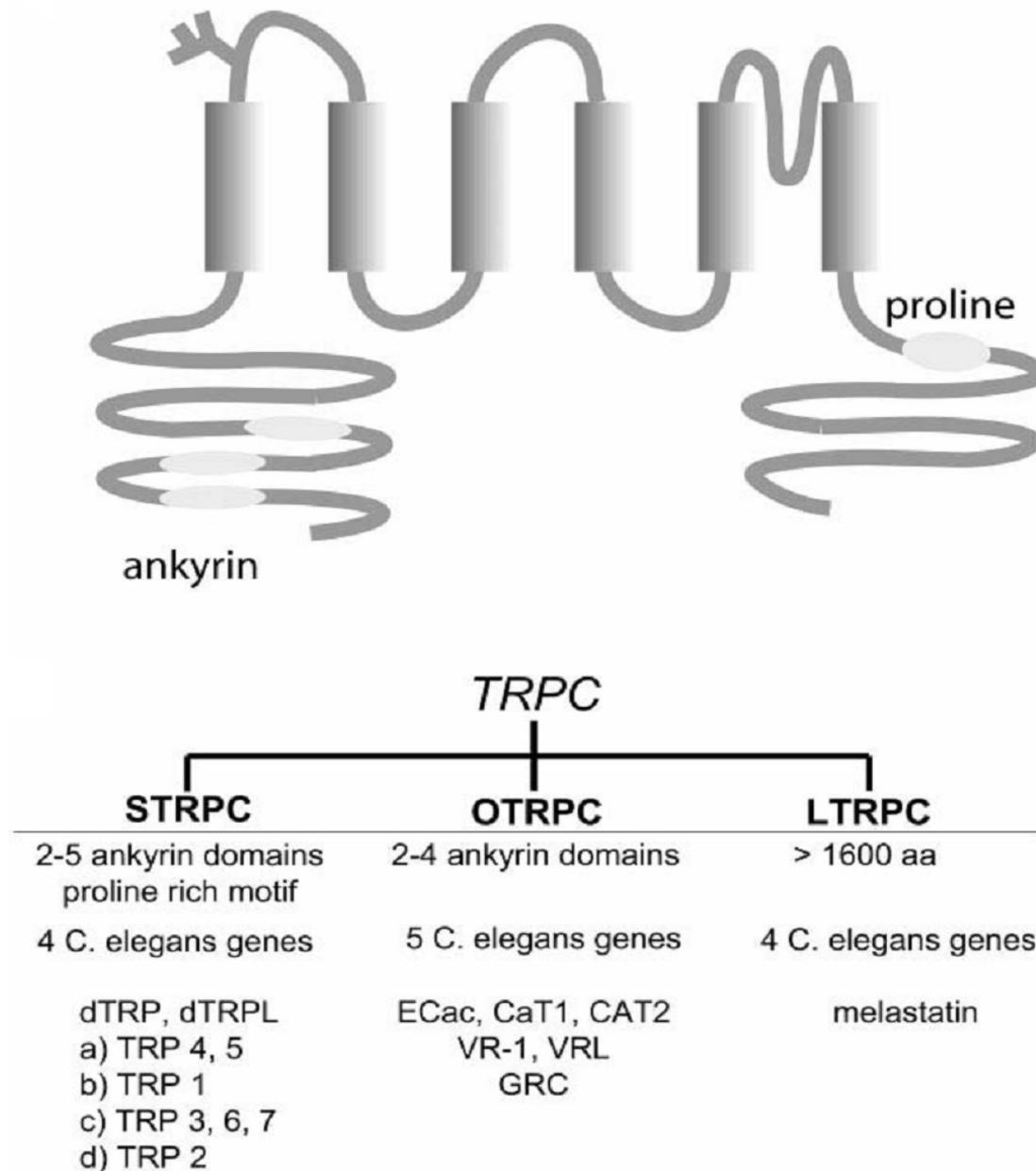


Abb. 1-10: oben: Proteinstruktur der „cononical-“ oder „short-TRP’s“ (aus Nilius, 2001). Das 6TM-Segment besteht aus 6 transmembranären Helices, die Kanalpore befindet sich zwischen Helix 5 und 6. Im N-terminalen Bereich finden sich Ankyrin-Bindungsstellen, der C-Terminus weist prolinreiche Motive auf. Es tetramerisieren jeweils 4 der 6TM-Segmente zu einem funktionsfähigen Kanal. Unten: Homologien der drei TRP-Unterfamilien STRPC (TRPC), OTRPC (TRPV) und LTRPC (TRPM).

weiterer partieller Sequenzen von mTRPC4, 5 und 6 wurden 1996 von Zhu veröffentlicht. Die Expression der beiden hTRP-Isoformen hTRPC1 und hTRPC3 in COS-M6Zellen führte im Fall von TRPC1 zu einem moderaten Anstieg des Ca^{2+} -Einstroms nach Stimulation mit Carbachol, wohingegen

hTRPC3 einen starken Anstieg herbeiführte.

Auch die Speicherentleerung mittels Thapsigargin führte bei hTRPC3 zu einem größerem Ca^{2+} -Einstrom als in Kontrollzellen. Diese Ergebnisse stellen die ersten Beweise für eine biologische Funktion von Säuger *trp*-Proteinen als Ca^{2+} -Kanäle dar. Die stabile Expression von sechs anti-*mtrp* Sequenzen in Ltk-Zellen führte nach Stimulation des IP₃-Signalweges zu einer vollständigen Inhibierung des kapazitativen Ca^{2+} -Einstroms (Zhu, 1996). Die Expression partieller antisense-*htrpC1* Fragmente in HEK293-Zellen resultiert ebenfalls in einer Reduktion des Thapsigargin-induzierten Ca^{2+} -Einstroms (Wu, 2000), woraus in beiden Fällen die Beteiligung von TRP-Homologen am speicheroperierten Ca^{2+} -Einstrom geschlossen wurde. Untersuchungen an TRPC4^{-/-} Mäusen zeigten im Vergleich zum Wildtyp einen stark verminderten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach tBHQ-induzierter Speicherentleerung und anschließender Reapplikation von extrazellulärem Ca^{2+} (Freichel, 2001).

Alle 28 Vertreter der heute bekannten eukaryotischen TRP-Kanäle kodieren für einen Ca^{2+} -permeablen, nicht-selektiven Kationenkanal und werden anhand ihrer Homologien in sechs Unterfamilien (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP und TRPML) eingeteilt. Obgleich die funktionale Bedeutung vieler TRP-Kanäle weiterhin unklar ist, lassen die bekannten Funktionen Rückschlüsse auf ein relativ frühes Auftreten dieser Proteine in der Phylogenese zu. In Hefen und Nematoden sind TRP-Kanäle an der sensorischen Signaltransduktion beteiligt und ermöglichen die Wahrnehmung verschiedener extrazellulärer Noxe (Denis, 2002; Zhou, 2003). Mäuse verfügen über Pheromon-sensitive TRP-Kanäle, welche ihnen das Unterscheiden zwischen männlichen und weiblichen Artgenossen ermöglichen. In ihrer Struktur sind TRP's anderen Ionenkanälen, wie beispielsweise den Ca^{2+} -aktivierbaren Kaliumkanälen, verwandt. Das Grundmotiv leitet sich von 6 transmembranären Helices (6TM) ab, welche sich als Homo- oder Heterotetramere zu einem funktionsfähigen Kanal zusammenfügen. Dabei bestimmt eine schlaufenförmige Struktur, die so genannte Pore, zwischen Segment 5 und 6 nach Tetramerisierung die Ionenselektivität und Leitfähigkeit des Kanals. Die N-terminalen Bereiche der meisten Isoformen beinhalten 3 konservierte Ankyrin Bindungsmotive. Im

Bereich des C-Terminus finden sich prolinreiche Motive. Weiterhin verfügen die meisten TRP's über Calmodulin-Bindungsstellen, welche mit einer Kalzium-abhängigen Modulation der Kanalaktivität assoziiert werden.

Mitglieder der „klassischen“ oder cononical TRPC-Kanäle weisen die größten Homologien zu dem ursprünglich in Drosophila entdeckten und an der

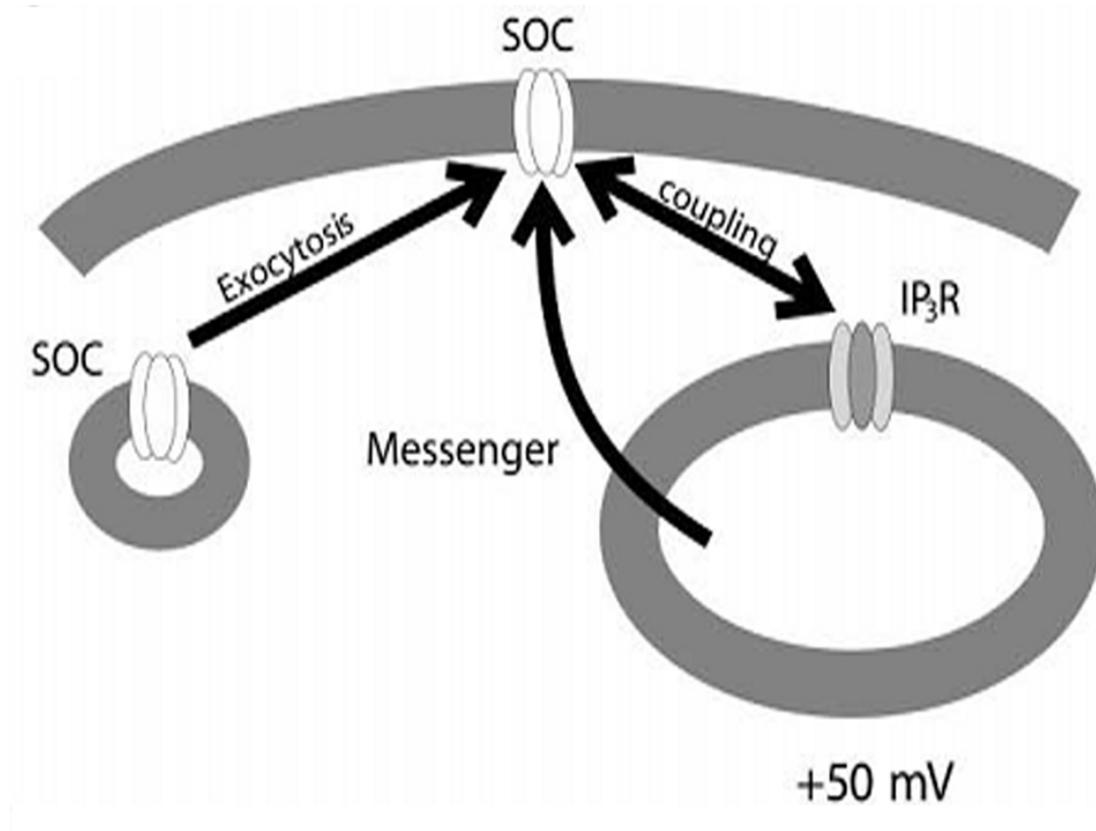


Abb. 1-11: Aktivierung von speicherregulierten Kanälen (SOC) erfolgt nach Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (aus Nilius, 2001). Der genaue Mechanismus ist unklar, jedoch werden drei Mechanismen diskutiert. 1) SOC-Vesikel werden über Exozytose in die Zellmembran integriert, 2) ein diffundierendes messenger-Molekül aktiviert die SOC nach Speicherentleerung oder 3) es existiert eine direkte Verbindung zwischen dem IP₃-Rezeptor und den SOC.

Photorezeption beteiligten TRP-Kanäle auf. TRPC's werden als speicheroperiert beschrieben und sind über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR's) und Tyrosin-Kinasen aktivierbar (Clapham, 2005). TRPC1, der als erstes in Säugetieren detektierte TRP-Kanal, heteromultimerisiert mit TRPC4 und TRPC5 und ist in Regionen des Hippocampus verschiedener Spezies nachgewiesen worden.

TRPC3, TRPC6 und TRPC7 sind in glatten Gefäßmuskelzellen hoch exprimiert, werden als wenig Kalzium-selektiv beschrieben und sind mittels DAG über eine nicht PLC-beteiligte Signalkaskade aktivierbar. Putney (2004) beschreibt TRPC3 als potentiellen IP₃R-bindenden SOC. Generell werden

TRPC's jedoch eher als rezeptoraktivierbare, nichtselektive Kationenkanäle angesehen.

TRPM1 (melastatin-type) wurde erstmals in stark metastasierenden Melanomzellen nachgewiesen. Obgleich auch in vielen anderen Geweben exprimiert, ist über die funktionalen und elektrophysiologischen Eigenschaften dieses Kanals wenig bekannt. TRPM2 ist durch Bindung von ADP ($EC_{50} \approx 100 \mu\text{M}$) und NAD^+ ($\approx 1 \text{ mM}$) an ein C-Terminal lokalisiertes NUDT9 (*nudix hydrolase domain*) Motiv aktivierbar, verfügt jedoch per se über keine Hydrolaseaktivität (Nagamine, 1998). Weiterhin postuliert Nagamine, dass dieser Kanal über ROS und $\text{TNF}\alpha$ aktivierbar ist und somit an der Regulation des intrazellulären Reduktions-Oxidationsgleichgewichts beteiligt sein könnte. TRPM3 wird als konstitutiv aktiv und durch hypotonische Bedingungen (ab ca. 200 mOsm) potenzierbar beschrieben, weist jedoch kaum Homologien zu dem ebenfalls osmosensitiven TRPV4 auf, was auf einen verwandten Aktivierungsmechanismus hindeuten würden. TRPM4 ist im distalen Tubulus der Niere sowie im ZNS hoch exprimiert (Fonfria, 2006) und repräsentiert gemeinsam mit TRPM5 die einzigen für monovalente Ionen selektiven Kanäle der gesamten TRP-Familie. TRPM6 und M7 verfügen als einzige bislang nachgewiesene Ionenkanäle über eine funktionale Kinase-Domäne (Clapham, 2003). TRPM7 leitet unter physiologischen Bedingungen nur einen geringen Einwärtsstrom, ist sowohl für Kalzium als auch für Magnesium permeabel und wird durch eine Konzentration von ca. 0,6 mM $[\text{Mg}^{2+}]_i$ vollständig inhibiert (Nadler, 2001; Runnels, 2002). Im Gegensatz zu anderen GPCR-aktivierbaren TRP-Kanälen steigt der TRPM7-medierte Strom in Ganzzelleableitungen nur langsam an und wird mittels $\text{PLC}\beta$ oder $\text{PLC}\gamma$ vermittelter PIP_2 Hydrolyse inaktiviert. Die Bedeutung der Kinase-Aktivität ist nicht hinreichend geklärt und für die Aktivierung des Kanals nicht erforderlich. Die hohe Mg-Sensitivität deutet jedoch auf eine Beteiligung an der Mg-Homöostase hin. TRPM8 wurde erstmals als hochregulierte mRNA in Prostatakarzinomzellen detektiert (Tsavaler, 2001). Dieser nicht-selektive, auswärtsrektifizierende Kanal scheint weiterhin eine sensorische Rolle bei der Wahrnehmung von Kälte zu spielen (Clapham, 2003). TRPM8 ist aktiv bei Temperaturen zwischen 8 und

28 °C und ist durch „kühlende“ Substanzen wie beispielsweise Menthol potenziierbar.

Bei den Mitgliedern der TRPP-Gruppe (TRPP2, 3 und 5) handelt es sich um die ursprünglich als *polycystic kidney disease proteins* bezeichneten PKD2, PKD2L1 und PKD2L2 welche wie alle anderen TRP's 6TM Ca²⁺-permeable Kationenkanäle bilden. Bei dem sehr viel längeren TRPP1 (polycystin-REJ bzw. Polycystin1L1) handelt es sich um ein 11TM Protein mit einer 6TM TRP-ähnlichen Domäne im C-terminalen Bereich. TRPP1 ist alleine nicht in der Lage einen funktionsfähigen Kanal zu bilden, als Komplex mit TRPP2 entsteht jedoch ein Ca²⁺-permeabler nicht-selektiver Kationenkanal (Qian, 2005). Mutationen im TRPP1 oder TRPP2-Gen führen zu autosomal dominanter polyzystischer Nierenerkrankung. Eine Interaktion zwischen TRPP und dem IP₃-Rezeptor wurde ebenfalls vorgeschlagen (Li, 2005).

1.5.1 TRP-Kanäle im Endothel

Auf der Basis der offenbar großen Vielfalt an Phänotypen für endotheliale Ca²⁺-permeable Kationenkanäle ist es wahrscheinlich, dass verschiedene Kanaltypen existieren, die in die endotheliale Kalziumhomöostase involviert sind. In einigen Zellen verhalten sich die Kanäle ähnlich den IP₃-Rezeptoren (Putney, 1997). Die Überexpression des Typ 3 Rezeptors führt zu einem erhöhten Ca²⁺-Einstrom über die Plasmamembran, ohne die Freisetzung aus den Speichern zu beeinflussen (DeLisle, 1996). Typ 3 IP₃-Rezeptoren könnten demzufolge die Funktion des kapazitativen Ca²⁺-Einstromkanals übernehmen.

Eine zunehmend große Bedeutung für die endotheliale Kalziumhomöostase erlangen verschiedene Vertreter der TRP-Kanäle. Teilweise gelten TRP's als Rezeptor-aktivierbar (sog. RACC – *receptor activated cation channel*), werden also nach Ligandenbindung aktiviert. Die große Anzahl der bislang beschriebenen RACC-Subtypen kann auf der Basis ihrer Kationenselektivität, des Öffnungsmechanismus und der physiologischen Funktion unterschieden werden. Die Selektivität dieser Ca²⁺-Kanäle variiert von hoch selektiv für Ca²⁺, bezeichnet als Ca²⁺-Kanäle, bis gering selektiv,

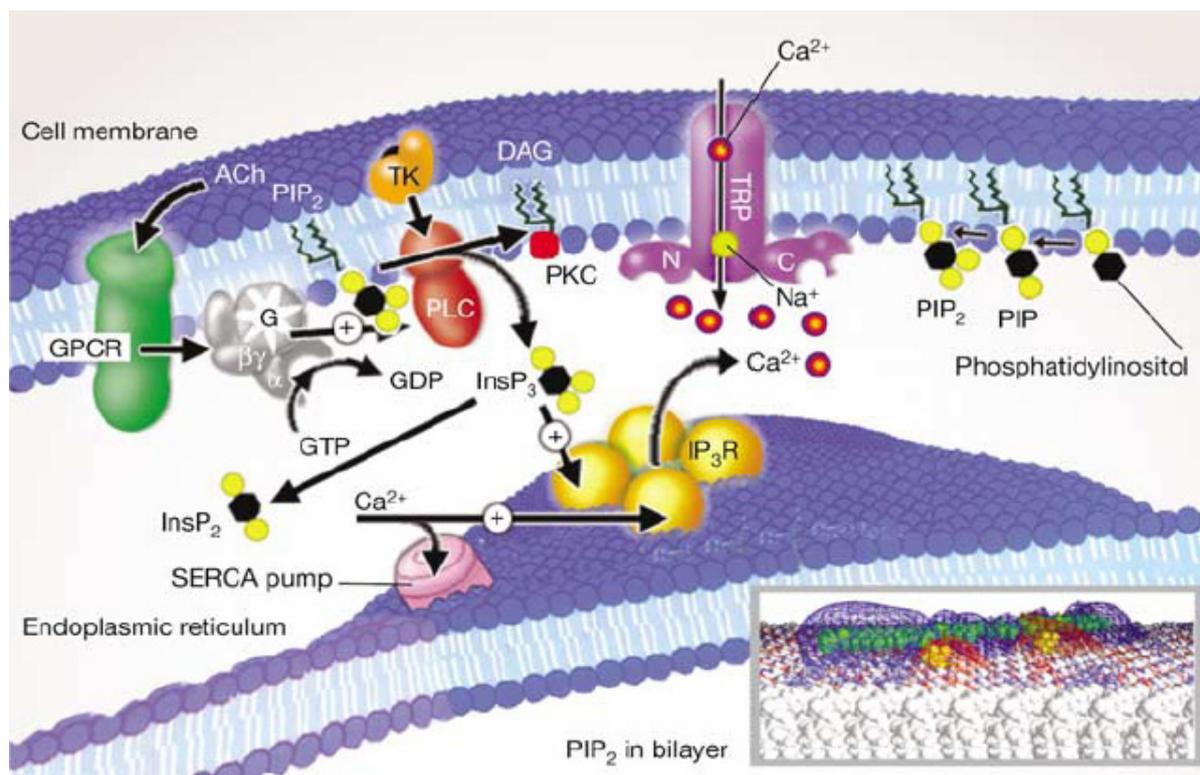


Abb. 1-12: TRPC-Kanäle werden über Signaltransduktionskaskaden aktiviert (aus Clapham, 2003). Die Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) führt zur Aktivierung der PLC β (alternativ aktivieren Tyrosinkinase-Rezeptoren die PLC γ) und nachfolgender Generierung von DAG und InsP $_3$. Welches Messengermolekül die TRPC nach der InsP $_3$ -induzierten Speicherentleerung aktiviert ist unklar.

als nicht selektive Kationenkanäle bezeichnet, wobei letztere hauptsächlich für Na⁺ permeabel sind (Fasolato, 1994; Berridge 1995; Parekh, 1997). Die zur Zeit am meisten untersuchte Subgruppe der RACCs ist die Gruppe der speicherregulierten Ca²⁺-Kanäle (SOCs oder auch den kapazitiven Ca²⁺-Einstrom (CCE) medierenden Kanäle) (Lewis, 1989; Hoth, 1992; Putney, 1993; Berridge 1995; Clapham, 1995; Birnbaumer, 1996; Friel, 1996; Lepple-Wienhues, 1997; Montell, 1997; Parekh, 1997). Viele als RACC's klassifizierte Kanäle werden mittels Signaltransduktionskaskaden unter Beteiligung der Phospholipase C (PLC) aktiviert. Insbesondere Mitglieder der TRPC's werden zu diesen nicht-selektiven, PLC-aktivierbaren RACC's gezählt. Ca²⁺-permeable, nicht-selektive Kationenkanäle wurden bislang in HUVEC'S beschrieben (Nilius, 1990 & 1993) und konnten mittels vasoaktiver Agonisten aktiviert werden. Es wurde beobachtet, dass der durch diesen Kanal medierte Strom nach Agonistenstimulation langsam anstieg, jedoch nur unter physiologischen Kalziumkonzentrationen auftrat. Unter kalziumfreien Bedingungen bzw. nach Beladung der Patch-Pipette

mit Kalzium konnte keine Kanalaktivierung beobachtet werden. Eine Aktivierung konnte ebenfalls nach Inhibition der Ca^{2+} -ATPase des sarco- bzw. endolasmatischen Reticulums mittels Thapsigargin (TG) bzw. tert-butylbenzohydrochinon (tBHQ) beobachtet werden. Der Agonisten-induzierte Kalziumeinstrom durch diesen Kanal gilt als IP_3 -abhängig. Weiterhin führte die Inhibition der PLC durch den Blocker U73122 zu einer Deaktivierung des Kanals. Ob es sich bei diesen Untersuchungen um einen TRP-Kanal handelte konnte von Nilius und Mitarbeitern jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Ein weiterer nicht-selektiver, Ca^{2+} -permeabler Kanal im Endothel wird von Baron (1994) beschrieben. Dieser Kanal ist Kalzium-aktivierbar, hat eine Leitfähigkeit von 44 pS für monovalente Kationen und ein Permeabilitätsquotienten ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$) von 0,7. Auch in Endothelzellen der Aorta wurde ein Agonisten-induzierter, nichtselektiver Kationenstrom, welcher nach Inhibition der Cyclooxygenase unterdrückt wurde, nachgewiesen (Himmel, 1994).

Die zentrale Fragestellung vieler TRP-Studien ist, ob diese Kanäle am kapazitiven Kalziumeinstrom beteiligt sind und als so genannte *store-operated-channels* fungieren. Jedoch sind die der TRP-Kanal Aktivierung zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen weitgehend unklar.

Die Aktivierungsmechanismen für TRPC3 sind eingehend untersucht worden. Zitt postulierte 1997 eine indirekte TRPC3-Stimulation über die $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Kiselyov zeigte 1998 an *inside-out-patches* von TRPC3-überexprimierenden HEK293 Zellen eine starke InsP_3 -induzierte Kanalaktivierung. Überexpression von TRPC3 und TRPC6 führte jedoch zu einer InsP_3 - und PKC-unabhängigen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in CHO-Zellen (Hofmann, 1999). Dieser PKC-unabhängiger Kalziumeinstrommechanismus wurde von Chakrabarti und Kumar (2000) an Lymphozyten eingehend untersucht und von Okada (1999) auf die DAG-induzierte Aktivierung von TRPC7 zurückgeführt. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass der DAG-induzierte Kalziumeinstrom im wesentlichen auf TRPC3 zurückzuführen ist (Halaszovich, 2000, Ma, 2000, McKay, 2000). Der Aktivierungsmechanismus wurde von Chyb (1999) auf die mehrfach ungesättigte Linolensäure zurückgeführt, welche als Produkt der

DAG-Lipase in der TRP- bzw. der TRPL-Drosophila-Mutante transiente Auswärtsströme aktivieren konnte. Eine denkbare Beteiligung der PLA₂ wurde in diesem Zusammenhang nicht näher untersucht. Kanzaki (1999) transfizierte ein dem VR-1 verwandtes Protein (GCR) in CHO-Zellen und beobachtete nach Stimulation mit IGF einen starken Anstieg der [Ca²⁺]_i. Antikörperfärbung zeigte eine Translokation von GCR aus diffusen intrazellulären Kompartimenten an die Zellmembran und führten zu einer weiteren Hypothese der TRP-Aktivierung (siehe Abb. 1-11)

1.6.2 Die TRPV-Familie

Auf der Suche nach Capsaizin- (8-methyl-N-vanillyl-6-noneamid) und Resiniferatoxin-sensitiven Vanilloid-Rezeptoren (VR) entdeckten Caterina und Mitarbeiter 1997 den ersten Vertreter der vanilloid-like TRPV's (heute TRPV1). Vorangegangene elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an sensorischen Neuronen der Ratte hatten sowohl einen Capsaizin-induzierten, auswärtsrektifizierenden Kationenstrom, als auch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Baccaglini, 1983; Bleakman, 1990) gezeigt. Da TRPV1 durch Hitze (≥ 43 °C) aber auch niedrige pH-Werte ($\geq 5,9$) und endogene Anandamid-Derivate aktiviert werden kann (Watanabe, 2003), schloss man auf eine Beteiligung des Kanals an der physikalisch oder chemisch induzierten Schmerzrezeption. Die Suche nach an der Kalziumresorption beteiligten Proteinen in der Niere und im Darmepithel führte zur Identifikation der hoch kalziumselektiven TRPV-Mitglieder TRPV5 (ECaC1, CaT2) und TRPV6 (ECaC2, CaT1). Diese Proteine weisen eine 80% Homologie und sehr ähnliche funktionelle Charakteristika zueinander auf, sind in der Lage zur Heteromultimerisation und werden elektrophysiologisch mit dem *calcium-release-activated-current* (I_{CRAC}) in Verbindung gebracht (Yue, 2001) Die übrigen Vertreter der TRPV-Familie, TRPV2, V3 und TRPV4 wurden über Datenbankanalyse anhand von Homologien zu TRPV1 bzw. des Verwandten Proteins OSM-9 aus *Caenorhabditis elegans* identifiziert. TRPV2 (VRL-1) ist in seiner Sequenz zu 50% mit TRPV1 identisch, ist jedoch nicht Capsaizin

bzw. pH-sensitiv und hat einen höheren Schwellenwert für thermale Aktivierung (≥ 52 °C). TRPV3, der als letztes in der TRPV-Familie klonierte Kanal, ist ebenfalls thermosensitiv und im physiologischen Bereich von 22 – 40 °C maximal aktivierbar.

Erste Untersuchungen zur TRPV4 (OTRPC4, TRP12) Expression in Vertebraten deuteten auf eine osmoregulative Funktion dieses Kanals im neurosensorischen System hin (Delaney, 2001; Liedtke, 2000; Nilius, 2000). Diese Erkenntnis wurde durch Untersuchungen an TRPV4-transfizierten HEK293 Zellen gestützt, welche auf die Reduktion der Osmolarität des extrazellulären Mediums und der damit einhergehenden Zellschwellung (sog. *hyposmotic cell swelling*, HCS) sowohl mit einem auswärtsrektifizierenden Kationenstrom als auch mit einer Herunterregulation des VRAC (*volume-regulated-anionic-channel*) reagierten. Die Forschungsarbeiten von Nilius und Mitarbeitern zeigten, dass TRPV4 als nicht-selektiver, für Ca^{2+} und Na^{+} permeabler Kationenkanal in verschiedenen Geweben exprimiert ist und durch verschiedene physikalische und chemische Stimuli, wie moderate Hitze ($\geq 30^{\circ}\text{C}$), nicht-PKC-aktivierende Phorbolster und Epoxyeicosatriensäuren (EET's), aktivierbar ist. Die Entdeckung des synthetischen TRPV4-Agonisten 4aPDD erbrachte einen großen Fortschritt in der funktionalen Charakterisierung des Kanals. Der Phorbol-Ester 4aPDD führt zu einer starken, direkten und spezifischen Aktivierung von TRPV4 (Nilius, 2003). Das nahe verwandte Phorbol-Derivat PDDHV, ein potenter Aktivator von TRPV1, führte in *inside-out patches* nicht zu einer TRPV4-Aktivierung (Nilius, 2003) und auch die Stimulation mittels des strukturell sehr ähnliche PKC-Aktivators PMA hatte in TRPV4-transfizierten HEK-293 Zellen lediglich einen schwach aktivierenden Effekt.

Der genaue Aktivierungsmechanismus für TRPV4 ist unklar. Es wird vermutet, dass die HCS-induzierte Aktivierung über die CYP450-katalysierte Umsetzung von Arachidonsäure (AA) zu 5',6'-Epoxyeicosatriensäure (5',6'-EET) vermittelt wird (Vriens, 2004). Eine durch Membranstreckung oder G-Protein vermittelte Aktivierung wird in der HCS-induzierten TRPV4-Aktivierung ausgeschlossen (Nilius, 2001). Die selektive Inhibierung der PLA_2 -vermittelten Freisetzung von AA verhinderte HCS-induzierte Ströme in transfizierten HEK293 Zellen, während die Aktivierung durch Hitze und

4aPDD unbeeinflusst blieb (Vriens et al. 2004). In Untersuchungen an aortalen Endothelzellen der Maus konnte die HCS bzw. AA-induzierten Ströme durch Induktion der CYP2C-Expression nach Vorinkubation mit Nifedipin verstärkt werden (Vriens, 2005). Weiterhin konnte von Nilius gezeigt werden, dass die im TM3-Segment N-terminal lokalisierte Aminosäure Tyr-555 für die 4aPDD-induzierte Kanalaktivierung essentiell ist. Der Austausch von Tyr555 gegen eine nicht-aromatische Aminosäure verhinderte die Kanalaktivierung nach Stimulation mit 4aPDD. Ein weiterer wichtiger Regulator der Kanalaktivität ist das Ca^{2+} selbst. Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führt zur Deaktivierung des Kanals ($\text{EC}_{50} \approx 400 \text{ nmol/l}$). Die Deaktivierung kann durch unphysiologisch hohe extrazelluläre Kalziumkonzentrationen beschleunigt werden. Unter kalziumfreien Bedingungen hingegen bleiben TRPV4-Ströme für einen längeren Zeitraum stabil (Watanabe, 2003). Der Aktivierungsmechanismus durch Hitze ($\geq 25^\circ\text{C}$) scheint in Verbindung mit den TRP-typischen N-terminalen Ankyrin-Bindungsdomänen zu stehen, da die Deletion dieser Motive die Hitze-Aktivierung verhinderte ohne einen Einfluss auf die 4aPDD-induzierten Stromantworten zu haben (Watanabe, 2002). Insgesamt ist davon auszugehen, dass verschiedene Signaltransduktionsmechanismen für die TRPV4-Stimuli existieren.

1.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Studie sollten drei Hypothesen untersucht werden:

- 1) Ist TRPV4 an der Endothel-abhängigen Vasodilatation beteiligt
- 2) Reguliert TRPV4 die mechanosensitive Endothelfunktion
- 3) Kann bei Hypertonie eine pathologische Kanalregulation festgestellt werden

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, welche Funktion TRPV4 bei der Endothel-abhängigen Vasodilatation haben.

Insbesondere sollte untersucht werden, ob TRPV4 als endothelialer Mechanosensor fungieren und durch die Wirkung hämodynamische Kräfte die intrazelluläre Kalziumkonzentration und das Zellpotential regulieren kann. Ein besonderer Schwerpunkt wurde darauf gelegt, die Untersuchungen an Gefäßpräparaten mit intaktem Endothel durchzuführen.

In vergleichenden Untersuchungen sollte schließlich geklärt werden, ob es bei Hypertonie zu Veränderungen der TRPV4-Expression und -Funktion kommt, die eine pathologisch veränderte Mechanosensitivität des Endothels und dadurch eine gestörte endotheliale Vasodilatation hervorrufen können.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole	(Sigma)
1-EBIO	(Tocris)
Acetylcholin	(Tocris)
Apamin	(Tocris)
tert-Butyl-Hydrochinon	(Sigma)
Capsaicin	(Tocris)
Capsazepin	(Tocris)
Carbinol	(Sigma)
Charybdotoxin	(Tocris)
Clotrimazol	(Sigma)
Dimethylsulfoxid	(Sigma)
D-(+)-Glukose	(Sigma)
DC-EBIO	(Tocris)
Gadolinium(III)chlorid	(Sigma)
Heparin	(Sigma)
Indometacin	(Sigma)
Miconazol	(Sigma)
MOPS	(Sigma)
N ^G -Nitro-L-Arginin	(Sigma)
Natriumnitrit	(Sigma)
Natriumnitroprussid	(Sigma)
Neomycin	(Sigma)
Phenylephrin	(Sigma)
Pyruvat	(Sigma)
Sulfaphenazol	(Merck)
Thapsigargin	(Sigma)

U491619	(Calbiochem)
U73122	(Calbiochem)

Alle anderen herkömmlichen Chemikalien wurden von der Firma Sigma-Aldrich mit der Qualitätsbezeichnung `pro analysi` bezogen.

2.2 Tiere

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten von der Firma Charles River GmbH (Wiga, Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden in Standardkäfigen gehalten, und es stand ihnen Standardnagerkost und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Für die Tiertötung und Organentnahme lag eine Genehmigung des Landesamtes für Arbeitssicherheit und Gesundheit Berlin mit der Nummer T213/93 vor.

2.2.1 genetisch determinierte Hypertonie

Bei der spontan hypertensiven Ratte (SHR) liegt eine genetisch determinierte Hypertonie vor. Die Ursache für das Entstehen der Hypertonie ist nicht bekannt. Ein einzelner genetischer Defekt, der ursächlich für die Entstehung der Hypertonie ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Die spontan hypertensive Ratte entwickelt ab der 8. Lebenswoche einen Hypertonus, der in der 14. Lebenswoche voll ausgebildet ist. Entsprechend wurden männliche Ratten im Alter von 14 bis 20 Wochen untersucht. Als Kontrolltiere wurden altersgleiche normotensive WKY-Ratten verwendet.

2.2.2 Blutdruckmessung

Mit der Schwanzmanschetten-Sphygmomanometrie wurde in den Vergleichsstudien bei jeder Ratte unmittelbar vor der Tötung mehrfach der

Blutdruck gemessen und jeweils die Ergebnisse der letzten drei Messungen gemittelt. Die Messung wurden mit einem Adiset-Blutdruckmeßsystem durchgeführt, bei dem während der langsamen Lockerung einer okkludierenden Manschette, bei welcher die Schwanzarterie reperfundiert wird, der Blutdruck mittels eines Drucksensors registriert wird.

2.2.3 Gefäße und Endothelzellen

Die Ratten wurden in tiefer Äthernarkose durch Entnahme des Herzens getötet. Die thorakale Aorta wurde vorsichtig frei präpariert, ohne Überdehnung des Gefäßes entnommen und in eine eiskalte PBS-Lösung überführt. Unter einem Stereomikroskop wurden die Adventitia und Blutreste entfernt und die Arterie längs aufgeschnitten. Das Gefäß wurde bis zur weiteren Untersuchung maximal 6 h in einem Kulturnährmedium (MEM-EARL) im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Gefäßsegmente direkt ins Experimentierbad überführt und so mit Histoacrylgewebekleber (Braun Melsungen AG) befestigt, dass die luminale Seite dem Bad zugewandt war und mit der Patchpipette erreicht werden konnte.

2.2.4 Zellisolierung aortaler Endothelzellen

Die Isolierung von aortalen Endothelzellen der Ratte erfolgte entsprechend etablierter Methoden (Naruse, 1993). Zusammenfassend wurden für die Isolierung von aortalen EC die Aorten in einer phosphatgepufferten NaCl-Lösung mit 0.25% Trypsin für 20 min. bei 37°C inkubiert. Die Endothelzellen wurden danach durch leichtes Abschaben mit einem kleinen scharfen Löffel geerntet und sofort in Zellkulturmedium (DULBECCO's MEM) transferiert. Für die Patch-Clamp-Experimente wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach 2-6 h, jedoch maximal 24 h nach der Zellisolierung benutzt.

2.3 Patch-clamp Untersuchungen

Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von Sakmann und Neher entwickelt und ermöglicht die Charakterisierung von einzelnen Ionenkanälen in Zellmembranen (Neher, 1976; Hamill, 1981). Die Bildung einer elektrisch dichten Verbindung zwischen einer hauchfein ausgezogenen Glaskapillare und der Zellmembran erlaubt die elektrische Ausmessung eines Membranareals von weniger als $1\mu\text{m}^2$. Hierbei wird die Zellmembran von der Glaskapillare (Patchpipette) angesaugt und die dabei entstehenden hohen Adhäsionskräfte führen zu einer hohen elektrischen Abdichtung. In dieser hochohmigen Verbindung (3-10 $\text{G}\Omega$), dem so genannten *seal*, können einzelne Ionenkanalströme aufgelöst werden. Mit Hilfe eines elektronischen Verstärkers wird das Membranpotential auf eine definierte Spannung geklemmt und der hierbei fließende Strom wird registriert. Das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen, die sich in dem Membranfleck, auch *patch* genannt, befinden, führt zu einer Änderung des Membranwiderstandes und damit dem Ohmschen Gesetz entsprechend zu einer Änderung des gemessenen Stroms.

2.3.1 Patch-clamp Konfigurationen

Für die Messung von Ionenströmen stehen mehrere Messkonfigurationen zur Verfügung, die durch verschiedene Manipulationen an dem Membranfleck (*Patch*) ermöglicht werden.

Es können selektiv Ionenkanäle in dem Patch selbst (*Cell-attached-Konfiguration*) oder in der gesamten Zelle (*Whole-Cell-Konfiguration*) abgeleitet werden. In der *Inside-out-Konfiguration* und *Outside-out-Konfiguration* können durch das Herausreißen eines Membranstückes Kanäle in der Membran zellfrei gemessen werden. Dabei ist entweder die ursprünglich zytoplasmatische Seite oder die extrazelluläre Oberfläche der Zellmembran der Badlösung zugewandt. Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich die

Ganzzelleableitung zur Anwendung kam, wird auf diese im Folgenden näher eingegangen.

2.3.1.1 Die *whole-cell* Konfiguration (Ganzzelleableitung)

Um in die *whole-cell*-Konfiguration zu gelangen, stellt man zunächst einen so genannten *cell-attached*-Patch her. Anschließend legt man im Pipetteninneren einen Unterdruck an, so dass die Zellmembran im Bereich der Pipettenöffnung durchbrochen und ein elektrischer Zugang zum Zellinneren hergestellt wird. Die Lösung im Inneren der Pipette steht hierbei direkt mit dem Zytosol in Verbindung und ermöglicht durch das Einbringen unterschiedlich konzentrierter Ionenlösungen eine genaue Kontrolle des intrazellulären Milieus (Pusch, 1988; Marty, 1983). Die bei der Ganzzelleableitung gemessenen Ströme und Potentiale geben die Summe der Einzelkanalströme der gesamten Zellmembran wieder. Einerseits ist es möglich, durch das Klemmen der Zelle auf verschiedene Potentiale den Gesamtzellstrom zu registrieren; andererseits kann über eine Stromklemme das Zellpotential bestimmt werden (siehe Abb. 2-1).

2.3.1.2 Die *cell-attached* Konfiguration (Einzelkanalableitung)

Nach Etablierung des Gigaseals können aufgrund der elektrischen Abdichtung nur noch die Ionenströme, die durch den Membranfleck unter der Patchpipette fließen, gemessen werden. Diese Messkonfiguration wird als *cell-attached*-Patch bezeichnet. Dabei konnten an der weiterhin intakten Endothelzelle einzelne Ionenkanäle untersucht werden. Um den Strom durch die Kanäle zu regulieren, wurde eine Klemmspannung zwischen der Messelektrode in der Patchpipette und der Silber-Silberchlorid-Referenzelektrode, die durch eine stromleitende Agarschicht isoliert war, angelegt oder die Ionengradienten geändert. Der Vorteil dieser Messkonfiguration liegt darin, dass die intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen und auch die Regulation der Ionenkanäle dabei unverändert bleiben. Jedoch ist das an der Membran anliegende Membranpotential nicht exakt definiert und die intrazelluläre

Ionenkonzentration nicht bekannt, so dass die auf den Kanal einwirkende elektrochemische Triebkraft nicht bekannt ist.

2.3.2 Stromaufzeichnung und Datenauswertung

Die Patch-clamp-Experimente wurden mit einem EPC-9 Patch-clamp-Verstärker durchgeführt (Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz). Der Patch-Clamp-Verstärker verstärkt die im Elektrodenkreis fließenden Ströme und konvertiert sie in entsprechende Spannungen. Das angelegte Klemmpotential konnte über einen externen Spannungsgeber auf einen gewünschten Wert zwischen +200 und -200 mV eingestellt werden. Durch das Klemmen des im Meßkreis fließenden Stroms auf null konnte auch das dazugehörige Zellpotential gemessen und auf einem Speicheroszilloskop (HM 408-Speicheroszilloskop, Fa. Velma, Großkrotzenburg) beobachtet werden. Die analogen Strom- und Spannungswerte wurden nach Filterung (1-2.3 kHz) von einem A/D Wandler digitalisiert und gespeichert.

Die computergestützte Datenauswertung erfolgte für die Einzelkanalaufzeichnungen mit dem Auswerteprogramm "Patch" (A. Rabe, Frankfurt) und für die Auswertung von Ganzzellstromableitungen mit M2Lab Analysis / Review (Fa. Heka Elektronik, Lambrecht/Pfalz).

2.3.2.1 Berechnung der Leitfähigkeit

Zur Erstellung einer Strom-Spannungskurve und für die Berechnung der Kanalleitfähigkeit (g) wurden die ausgemessenen Stromamplituden der jeweils angelegten Klemmspannung zugeordnet und die Datenpunkte mit einer Kurve angeglichen.

$$I = \frac{\frac{g^{*Na}}{[Na]^*} [Na]_a + \frac{g^{*K}}{[K]^*} [K]_a + \frac{g^{*Cl}}{[Cl]^*} [Cl]_i - \left(\frac{g^{*Na}}{[Na]^*} [Na]_i + \frac{g^{*K}}{[K]^*} [K]_i + \frac{g^{*Cl}}{[Cl]^*} [Cl]_a \right) * e^{VF/RT}}{1 - e^{VF/RT}} * V \quad (1)$$

Bei linearen Strom-Spannungsbeziehungen wurden lineare Regressionen berechnet. Bei nichtlinearen Beziehungen, die sich z.B. ergeben, wenn neben der elektrischen noch eine chemische Triebkraft den Kanalstrom beeinflusst, wurden die Datenpunkte mit der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung (1) angeglichen. Durch Minimierung der Fehlerquadratsumme wurde ein möglichst guter Näherungswert für die mittlere Leitfähigkeit (g^*) und das Umkehrpotential (E_{rev}) berechnet (Hille, 1984). R steht für die allgemeine Gaskonstante, T ist die Temperatur in K, F die Faraday-Konstante; $[Ion]_i$ ist die Konzentration des betrachteten Ions auf der zytosolischen Seite des Patches, $[Ion]_a$ ist die Konzentration des betrachteten Ions auf der extrazellulären Seite. $[Ion]^*$ ist die maximale Konzentration, in der das betrachtete Ion in isotonischen Lösungen vorkommen kann (bei Säugern ca. 150 mmol/l). g^*_{ion} ist die Referenzleitfähigkeit, die der Kanal in isotonischer Lösung hätte, wenn das betrachtete Ion symmetrisch in der Konzentration $[Ion]^*$.

2.3.2.2 Berechnung der Ionenselektivität

Bei Ionengradienten über die Membran, kann aus E_{rev} , das Permeabilitätsverhältnis der Ionen und somit die Ionenselektivität des

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}[Na]_a + P_K[K]_a + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_a} \quad (2)$$

$$E_{rev} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K[K]_a}{P_K[K]_i} \quad (3)$$

Kanals bestimmt werden. Mit der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung (2) für

das Umkehrpotential sind die Anteile von verschiedenen monovalenten Ionen am Gesamtpotential nach dem Permeabilitätskoeffizienten gewichtet. Eine Korrektur des Permeabilitätsverhältnisses wurde für zweiwertige Ionen vorgenommen.

Bei einer sehr hohen Selektivität eines Kanals für ein Ion (hier z. B. $P_K \gg P_{Na}$ oder $P_K \gg P_{Cl}$), kann die Nernst-Gleichung (3) angewendet werden.

2.3.3 Versuchsablauf

Frisch isolierte ACC wurden longitudinal aufgeschnitten und auf einer Haltekapillare befestigt, um direkten Zugang zur luminalen Seite zu bekommen. Für die Isolation von Endothelzellen wurden die Gefäßstücke mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS ohne Ca^{2+}/Mg^{2+} für 15 min vorinkubiert. (Kohler, 2001). Um die Substanzen auszuwaschen, wurden die ACC für 5 min mit PBS überspült.

Mithilfe eines Mikroskops wurden einzelne EC selektiv mit einer Patchpipette fixiert und mechanisch von der Gefäßwand getrennt.

Zunächst wurde zwischen der Patchpipette und der Zellmembran ein hochohmiges, so genanntes Seal hergestellt (*cell attached Patch*). Durch kurzes Anlegen eines starken Unterdruckes in der Patchpipette wurde die Membran zwischen Pipette und Zellinnerem aufgebrochen. Die dann registrierbaren Ströme und Potentiale entsprechen der Summe der Einzelkanalströme der gesamten Zellmembran. In dieser so genannten *whole-cell* Konfiguration ist die Messung der Ganzzellströme über die Spannungsklemme sowie die Bestimmung des Zellpotentials über eine Stromklemme möglich. Da die Zellmembran Kondensatoreigenschaften hat, kann die Zellgröße entsprechend der Gesamtfläche der Membran mit der Zellkapazität angegeben werden. Mit dieser Methode lassen sich die Zellen auch mit einer gewünschten Lösung dialysieren, da sich das Zytosol mit der Pipettenlösung austauscht. Die Membranströme in diesen elektrisch isolierten Zellen wurden mit einem EPC9 Patch-Clamp Verstärker aufgenommen.

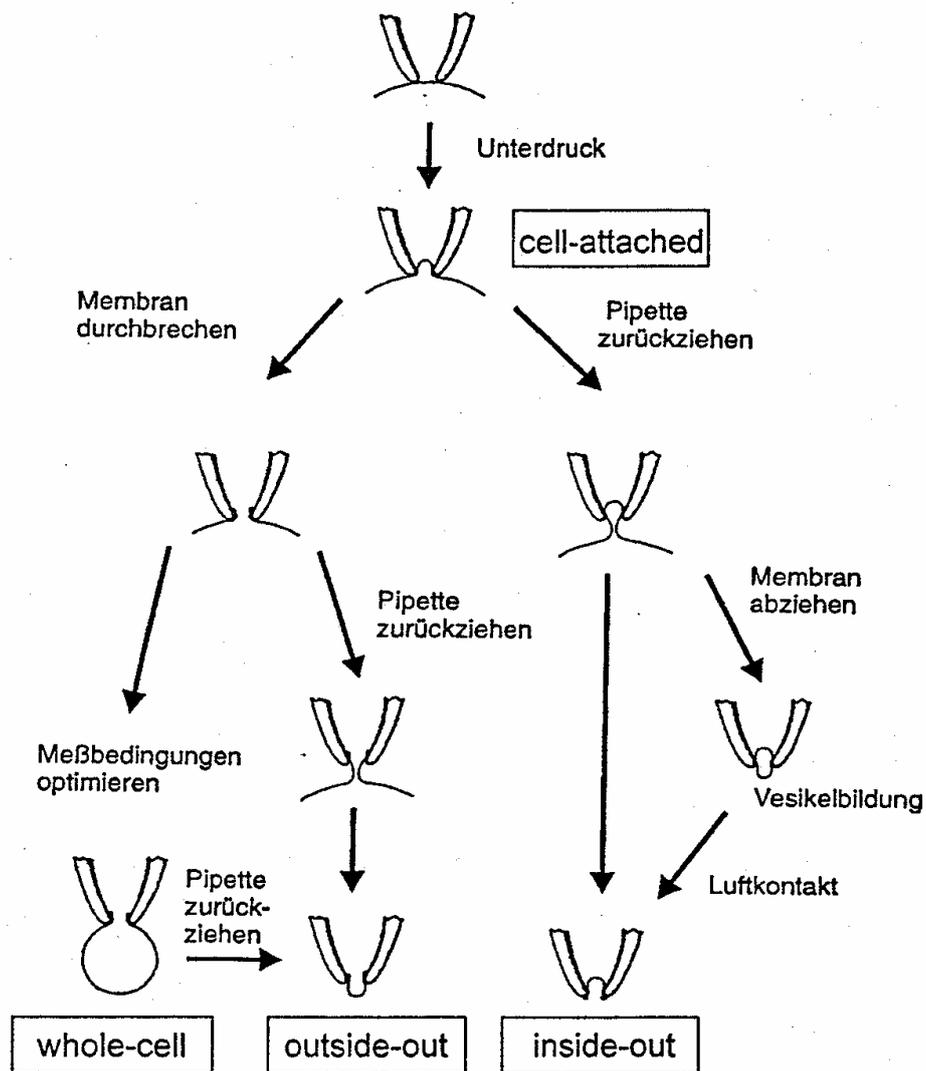


Abb. 2-1: Erstellung der verschiedenen Konfiguration der Patch-clamp Technik (Hamill, 1981).

Dabei wurden Spannungen von -100 mV bis $+100$ mV bei einer Dauer von 1000 ms benutzt. (Köhler, 2000) Die Veränderung des Membranpotentials als Antwort auf ACh (200 nM) wurden in elektrisch gekoppelten RCAEC gemessen und im *current-clamp* Modus des EPC9 Verstärkers aufgenommen. Der Widerstand der Patch Pipetten betrug $2-4$ M Ω in symmetrischer KCl-Lösung. Die Experimente wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.4 Fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Für die fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde die Fura-2 Methode verwendet (Grynkiewicz, 1985). Der Kalziumindikator Fura-2 verändert in Abhängigkeit von der Bindung des Kalziumions sein Exzitationspektrum. Ungebundenes Fura-2 wird bei einer Wellenlänge 380 nm angeregt, wohingegen an Kalzium gebundenes Fura-2 bei dieser Wellenlänge nicht detektiert wird. Wenn nun in mit Fura-2 beladenen Zellen die intrazelluläre Kalziumkonzentration ansteigt, erhöht sich die Intensität der Emission des an Kalzium gebundenen Fura-2, während die des ungebundenen Fura-2 abnimmt. Über die Bildung des Quotienten (Fluoreszenzratio) der Intensität der Emission (500-530 nm) bei den beiden Anregungswellenlängen (340 nm / 380 nm) können Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration dargestellt und quantitativ erfasst werden. Die quantitative Bestimmung der Konzentrationveränderung wurde über folgende Gleichung ermittelt:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}} \right)$$

Hierbei ist $[\text{Ca}^{2+}]$ die Kalziumkonzentration; K_d (224 nmol/l) die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Kalzium; R der Fluoreszenzratio; R_{\min} und R_{\max} ist die Fluoreszenzratio der Emission (500-530nm) bei null Kalzium bzw. bei Kalziumsättigung; S_{f2} ist der Koeffizient für null Kalzium bei der Wellenlänge 340 nm und S_{b2} ist der Koeffizient für Kalziumsättigung bei der Wellenlänge 380 nm. R_{\min} , R_{\max} , S_{f2} und S_{b2} sind in der Regel konstant und hängen vom Fluoreszenzmesssystem, von der Kalibrierungsmethode und den untersuchten Zellen ab. Zur Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurden die Endothelzellen zunächst in serumfreies Kulturmedium überführt. Nach 15 min wurden dann die Zellen in Kulturmedium mit 5 $\mu\text{mol/l}$ Fura-2 AM bei 37°C für 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach Waschen mit Kulturmedium wurden die Zellen

direkt für die fluoreszenzmikroskopische Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration verwandt.

Im Experiment wurde die niedrigste Fluoreszenzratio als R_{\min} angenommen. R_{\max} wurde bestimmt, indem über die Zerstörung der Zellmembran mit einer 3 mol/l KCl, 5 mmol/l CaCl_2 Lösung eine Sättigung des Fura-2 erzielt wurde.

2.5 Untersuchungen am Druckmyograph

Mit dem Druckmyographen kann die Vasoreagibilität verschiedener Gefäßtypen untersucht werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Geräten sind hier Messungen unter fast physiologischen Bedingungen möglich. Intravasaler Druck, Perfusionsgeschwindigkeit und Temperatur können während eines Experimentes konstant gehalten werden und Testsubstanzen intra- und extravasal appliziert werden. Der Gefäßdurchmesser wird dabei kontinuierlich über eine Videokamera gemessen.

2.5.1 Versuchsaufbau

Zunächst wurde das Experimentierbad unter einem inversen Mikroskop befestigt. Das Experimentierbad verfügte über einen Zu- und Abfluß, über den jeweils der Druck vor und hinter dem zu untersuchenden Gefäß manuell reguliert werden konnte. Dies wurde durch zwei über einen Joystick höhenverstellbare Flüssigkeitsreservoirs ermöglicht, die über ein Schlauchsystem mit dem Zu- und Abfluss des Experimentierbades in Verbindung standen. Der intravasale Druck wurde kontinuierlich von Drucksensoren gemessen und aufgezeichnet. Die Temperatur des Experimentierbades betrug 37°C , und wurde mit einem Messfühler kontinuierlich gemessen. Mit einer sich unterhalb des Experimentierbades befindlichen Videokamera war es möglich, die Veränderungen des Gefäßdurchmessers kontinuierlich aufzuzeichnen, und am angeschlossenen Monitor direkt zu verfolgen. Über den Bildschirm wurden zusätzlich der

äußere Gefäßdurchmesser, die Temperatur in der Badlösung und der intravasale Druck des Gefäßes kontinuierlich gemessen.

Über einen Dreiwegehahn am Zuflusssystem konnten mit einem separaten Schlauchsystem verschiedene Substanzen intravasal appliziert werden. Der hydrostatische Druck blieb konstant, da sich die Behältnisse auf gleicher Höhe, wie das den intravasalen Druck erzeugende Flüssigkeitsreservoir am Zulauf befand.

Die Bad- und Perfusionslösung war eine physiologische saline Lösung, die zum Teil zusätzlich den NO-Synthase- Inhibitor N^G-Nitro-L-Arginin (L-NNA, 100 µmol/l) sowie den Cyclooxygenase- Inhibitor Indometacin (10 µmol/l) zur Unterbindung sowohl der NO- als auch der Prostazyklin-Synthese enthielt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

2.5.2 Gefäßpräparation

Die Ratten wurden in tiefer Äthernarkose durch Entnahme des Herzens getötet. Die *Arteria carotis communis* (ACC) wurde vorsichtig unter Vermeidung einer Überdehnung herauspräpariert und in eine eiskalte phosphatgepufferte NaCl-Lösung (PBS) überführt. Unter einem Stereomikroskop wurden die Adventitia und Blutreste entfernt. Für die Vasoreagibilitätsmessungen am Druckmyographen wurden die Gefäße in 4-5 mm lange Stücke geschnitten.

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

2.6.1 Die „Multiplex“ Einzelzell-RT-PCR

Die erstmalig von Lambolez und Mitarbeitern (Lambolez, 1992) angewandte Kombination von Patch-Clamp-Technik und RT-PCR-Methode ermöglicht den molekularbiologischen Nachweis von zuvor elektrophysiologisch

charakterisierten Ionenkanälen anhand der Analyse geringer mRNA-Mengen der untersuchten Zelle. Einen Überblick über dieses Verfahren vermittelt Abbildung 2-2.

Die sog. „Multiplex“-Einzelzell-RT-PCR ermöglicht unter Einsatz unterschiedlicher Primerpaare den gleichzeitigen Nachweis verschiedener cDNA-Produkte in einem Reaktionsgefäß. Um bei der Einzelzell-RT-PCR eine optimale Ausbeute aus den sehr geringen mRNA-Mengen einer einzelnen Zelle zu erhalten und die Entstehung unspezifischer Produkte zu vermeiden, wendet man eine sog. verschachtelte „*nested*“-PCR an. Dabei schließt sich an die oben beschriebene PCR eine zweite PCR an, in der die in der ersten Phase entstandenen DNA-Moleküle als Matrize dienen. Die dann eingesetzten „*nested*“ Primer sind zu weiter innen gelegenen Zielsequenzen komplementär und hybridisieren innerhalb des Abschnitts, der von den ersten Primerpaaren vorgegeben wurde. Unspezifische Produkte bilden für die inneren Primer nicht mehr genügend komplementäre Sequenzen und entfallen somit als Matrizen. Folglich kommt es vorzugsweise zur sequenzspezifischen Amplifikation der Zielsequenz.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primersequenzen wurden so gewählt, dass sie innerhalb des kodierenden Bereichs lagen und Intron-überspannend waren, um eine Amplifikation genomischer DNA-Sequenzen zu vermeiden.

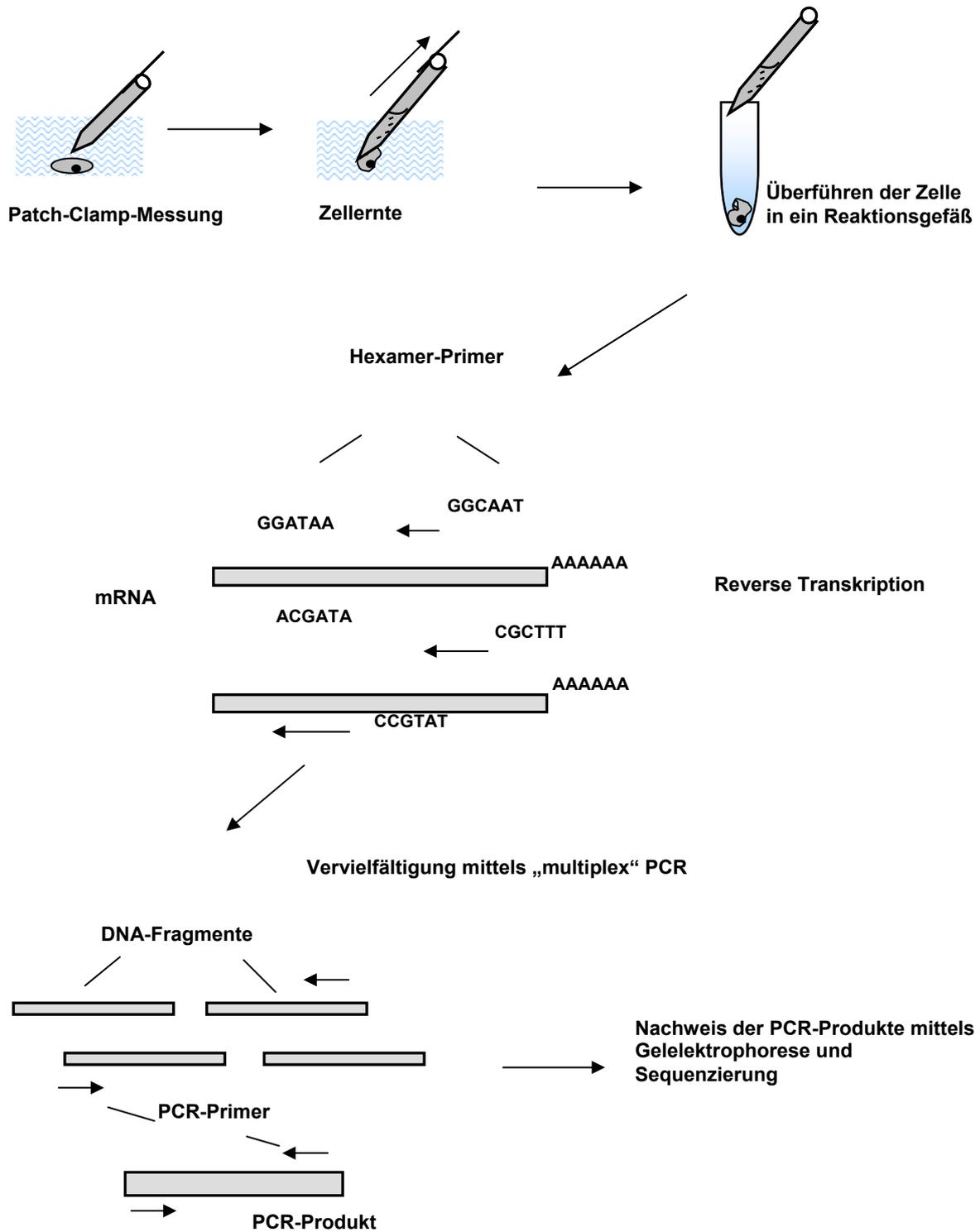


Abb. 2-2: schematische Darstellung der „multiplex“ single-cell-PCR. Es können simultan bis zu 6 Zielsequenzen der mRNA einer einzelnen Zelle amplifiziert werden.

2.6.1.1 Durchführung

Die geerntete Zelle sowie der Inhalt der Patchpipette (~ 8 µl) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, das die Reagenzien für die Reverse Transkription enthielt. Diese Lösung setzte sich aus 1 µl First Strand Puffer, 0,5 µl dNTPs, 1µl Random Hexamere Primer, 1 µl DTT und 0,5 µl RNasin zusammen. Die Proben wurden auf Trockeneis „Schock-gefroren“, um ein Aufbrechen der Zellmembran zu bewirken. Nach Auftauen der Probenlösung wurden 0,5 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben, so dass das Endvolumen der RT-Proben ~ 12 µl betrug. Die RT-Proben wurden im *Cycler* bei folgenden Temperaturen inkubiert: 10 Minuten bei 21° C, 60 Minuten bei 37° C und 4 Minuten bei 94° C.

2.6.2 Primer

Name	GenBank™ Acc. Nr.		Sequenz
rTRPV1	NM_031982	s as	5' AGCTGAAAAACACCGTTGGG 3' 5' GCTGGAATCCTCGGGTATAGTAGAG 3'
rTRPV1 NE		s as	5' CTTCTTCTTCCGAGGGATTCAA 3' 5' GAGAACACCATGGAAGCCACAT 3'
rTRPV2	NM_017207	s as	5' ACAGTCCTGCATGCTCTGGTAA 3' 5' TGCCACAGAGGACAGGTCGTA 3'
rTRPV2 NE		s as	5' TTGCAGATAACTCGCCTGAGAA 3' 5' CCGCACAGGACCGTAACAC 3'
rTRPV3	XM_573134	s as	5' GCTCTACTATACCCGAGGATTCCA 3' 5' GCCGATGGTGAACCTGAACA 3'
rTRPV3 NE		s as	5' CTTCCAGTCTATGGGCATGTACAG 3' 3' CACCGCATCGCTGAAGCT 3'
rTRPV4	NM_023970.1	s as	5' ACAACACCCGAGAGAACACCAA 3' 5' AAGAATACACAGGCCCGTAGGC 3'
rTRPV4 NE		s as	5' TGACCTGTTGCTTCTCAAGTGC 3' 5' TTGAACTTGCGAGACAGGTGC 3'
rTRPV5	NM_053787	s as	5' CCAACTCAGATGGAGAGGTGG 3' 5' TGAGCATGAGCAGTGTGGC 3'

Name	GenBank™ Acc. Nr.		Sequenz
rTRPV5 NE		s as	5' CATGTACTTTGCCAGAGGATTCC 3' 5' AAGGCAGCGTAGGTGATGCT 3'
rTRPV6	NM_053686	s as	5' TTTGGTGACTTGATGCGATTCT 3' 5' GAAGGGCAGATCCACGTCAT 3'
rTRPV6 NE		s as	5' GCCCGTAGGCCAGTCTATCTAT 3' 5' CACCATGGAAGCCAGCTGAAGC 3'

2.6.3 quantitative TaqMan-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Genexpression wurde als sensitive, reproduzierbare und spezifische Nachweismethode die so genannte TaqMan™ PCR eingesetzt. Diese auf dem ursprünglich von Holland (1981) entwickelten 5' Nuklease-Assay basierende Methode ermöglicht unter Einsatz fluorogener Sonden die Amplifikation und Quantifikation simultan in einem Reaktionsgefäß. Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum *Quencher* durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern zunächst an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase nun auf diese Sonde und beginnt sie zu hydrolysieren, wodurch die räumliche Nähe - und somit auch der FET - zwischen Reporter und *Quencher* unterbrochen wird. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt so die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch, da freie, nicht hybridisierte Sonden nicht geschnitten und nicht 100%ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden noch bevor die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert wird. Die Veränderung der Fluoreszenz wird mit Hilfe eines Laser-Detektors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.

2.6.3.1 Quantifizierung

Da für die Quantifizierung der Expression über eine endogene Kontrolle (GAPDH) normalisiert wurde, wurden zunächst Standardkurven für die endogene Referenz sowie die Zielsequenz erstellt. Von diesen wurde für die einzelnen Proben die Menge an Zielsequenz und endogener Referenz berechnet. Anschließend wurden die Zielsequenzwerte normalisiert, indem sie durch die Menge an endogener Referenz dividiert werden. Ein Probenmaterial wird wiederum als Kalibrator definiert, d.h. auf 1 gesetzt. Schließlich werden die normalisierten Zielsequenzwerte durch den normalisierten Zielsequenzwert des Kalibrators dividiert, um so ein relatives Expressionsniveau auszudrücken.

Die Konzentration der Zielsequenz, normalisiert mit GAPDH als endogener Referenz und relativ zu einem Kalibrator, wurde wie folgt berechnet:

$$X_{N, \text{kal}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.6.3.2 Sonden

Name	GenBank Acc. Nr.	Sequenz
rGAPDH	X02231	6-FAM CCCATCACCATCTTCCAGGAGCGA - TAMRA
rTRPV1	NM_031982	6-FAM ATTCCTGCAGAGGCGACCATCCC - TAMRA
rTRPV4	NM_023970.1	6 - FAM CCCGCCTCTTCCCAGACAGCAA- TAMRA

2.8 Puffer und Lösungen

2.8.1 Pipettenlösungen

In Tabelle 1 sind die in der vorliegenden Studie eingesetzten Pipettenlösungen aufgeführt. Dabei wurde mit Lösung A die Spitze und anschließend mit Lösung B das Lumen der Patchpipette befüllt.

Tabelle 1

KCl	140	4.3	-	140
NaCl	-	140	-	-
CaCl ₂	1	1	90	.1
MgCl ₂	1	1	1	1
Hepes	10	10	10	10
PH	7.4	7.4	7.4	7.2
[Ca ²⁺] _{frei}	1	1	90	.1
Nystatin	-	-	-	200-300 µg/ml

Konzentration in mmol/l

2.8.2 Badlösungen

Für die Einzelkanalmessungen wurden die Lösung A-C als KCl-Lösung (A), NaCl-Lösung (B) bzw. CaCl₂-Lösung (C) verwendet. Die Lösungen E-K mit den unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen wurden für die Messung der Kalziumabhängigkeit von TRPV4 eingesetzt. Die Lösung D war die Standard-Perfusionslösung bei den *shear stress*-Untersuchungen.

Tabelle 2 A B C D E F G H I J

KCl	140	4.3	-	5	140	140	140	140	140	140
NaCl	-	140	-	118	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂	1	1	90	1.4	.994	.835	.955	9	1	-
MgCl ₂	1	1	1	1	-	-	-	3	2	-
Hepes	10	10	10	20	10	10	10	10	10	10
EGTA	-	-	-	-	1	-	1	10	1.2	10
HEDTA	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
D-Glucose	-	-	-	5.5	-	-	-	-	-	-
PH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
[Ca ²⁺] _{frei}	1	1	90	1.4	20	6	3	1.5	0.4	-

Konzentration in mmol/l bzw. in µmol/l

2.8.3 Perfusionspuffer

Tabelle 3

KCl	5	5	5
NaCl	118	118	118
NaH ₂ PO ₄	1	1	1
CaCl ₂	9	20	1.4
MgCl ₂	3	3	1
Hepes	10	10	10
EGTA	10	10	10
HEDTA	-	-	-
D-Glucose	5.5	5.5	5.5
PH	7.4	7.4	7.4
[Ca ²⁺] _{frei}	1.5	2000	0.02

Konzentration in mmol/l bzw. in $\mu\text{mol/l}$

3. Ergebnisse

3.1 TRPV4 Expression im nativen Endothel der Ratte

Der molekularbiologische Nachweis zur TRPV4-Expression erfolgte mittels der multiplex-Einzelzell-RT-PCR (vgl. Abschnitt 2.7.1). Im Rahmen dieser PCR wurden nativen Endothelzellen direkt von der luminalen Gefäßseite „geerntet“ und auf die Expression sämtlicher TRPV-Familienmitglieder (V1 – V6) untersucht. Als Endothelzell-spezifischer Marker wurde die eNOS ko-amplifiziert.

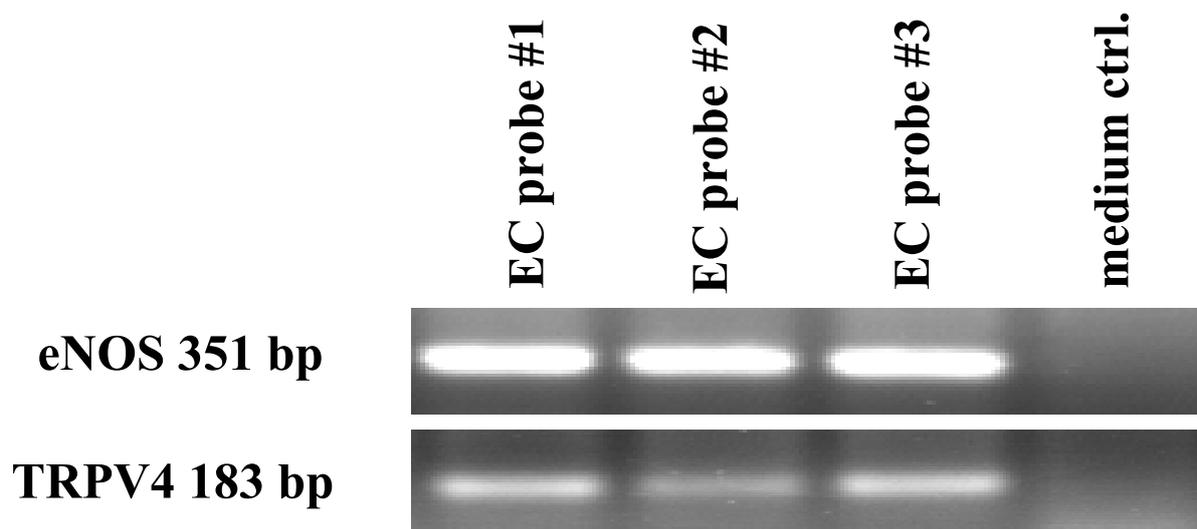


Abb. 3-1: Ergebnisse der multiplex-Einzelzell-RT-PCR. Von allen TRPV-Mitgliedern wurde am nativen Endothel der Ratte nur TRPV4 nachgewiesen.

TRPV4-Expression wurde in sieben von zehn Endothelzell-Proben nachgewiesen. Der fehlende Nachweis von TRPV4 und eNOS in drei Proben ist auf den Verlust der Endothelzelle beim Überführen von der Badkammer in das PCR-Reaktionsgefäß zurückzuführen. TRPV4 wurde als einziger Vertreter der TRPV-Familie im Endothel der Ratte nachgewiesen. Die Untersuchung von glatten Gefäßmuskelzellen erbrachte kein positives Signal für TRPV4-Expression (0/14 Proben).

3.2 elektrophysiologische Charakterisierung von TRPV4 im Endothel der Ratte

3.2.1 Leitfähigkeit und Selektivität

Die elektrophysiologische Charakterisierung von TRPV4 erfolgte am intakten Endothel der *Arteria Carotis Communis* (ACC) der Ratte (vgl. Abschnitt 2.3.3). Nach elektrophysiologischer Charakterisierung wurden die Endothelzellen durch vorsichtiges Herausreißen aus dem endothelialen Gewebeverband vereinzelt und für die molekularbiologische Untersuchung in ein Reaktionsgefäß (*PCR-tube*) überführt. Diese Kombination von *patch-clamp* und *single-cell-PCR* Untersuchung ermöglicht einen direkten Vergleich zwischen den elektrophysiologischen Eigenschaften einer Zelle und dem Expressionsmuster von Ionenkanälen. Wie in Abb. 3-2 dargestellt, zeigen Endothelzellen der ACC in Ganzzelleableitungen nach pharmakologischer Aktivierung durch den selektiven TRPV4-Agonisten 4aPDD eine charakteristische Strom-Spannungs-Kurve mit Auswärtsrektifizierung im stärker positiven Potentialbereich. Das Umkehrpotential befindet sich im Bereich von 0 mV. Die mittlere Leitfähigkeit des Kanals beträgt $98 \text{ pS} \pm 19 \text{ SD}$ im positiven und $60 \text{ pS} \pm 12 \text{ SD}$ im negativen Potentialbereich. Repetitive Stimulation mittels 4aPDD resultiert in einer reduzierter Aktivierbarkeit des Kanals. Weiterhin erwiesen sich TRPV4-Ströme als von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig. Während 4aPDD-induzierte Ströme nach Kalziumpufferung mit EGTA für mehrere Minuten stabil blieben, führten physiologische Kalziumkonzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 1 \text{ mmol/l}$) zu einer schnellen Abnahme des Einwärtsstroms (ca. 10 - 20 sec nach Applikation). Weiterhin zeigte sich die kanaltypische Auswärtsrektifizierung nach Kalziumpufferung stärker ausgeprägt (siehe Abb. 3-2. C) als unter physiologischen extrazellulären Kalziumkonzentrationen. Substitution von Na^+ -Ionen durch das impermeable Kation NMDG⁺ verhinderte 4aPDD-aktivierte Einwärtsströme (Abb. 3-2 B). Hohe extrazelluläre Kalziumkonzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}} = 20 \text{ mmol/l}$) verschieben das Umkehrpotential in den positiven Potentialbereich ($U_{\text{rev}} \approx 14 \text{ mV}$).

3.2.2 Inhibierung durch Kanalblocker

Pharmakologisch können TRPV-Kanäle durch die spezifische Kanalblockersubstanz Ruthenium Red (RuR) gut charakterisiert werden. Auch Gadoliniumionen (Gd^{3+}) sind in der Lage, verschiedene Arten von TRP-Kanälen zu blockieren. Entsprechend konnten in Ganzzelleableitungen TRPV4-medierte Ströme am intakten Endothel der *Arteria Carotis Communis* durch Zugabe von $1 \mu\text{mol/l}$ RuR in die Badlösung vollständig blockiert werden.

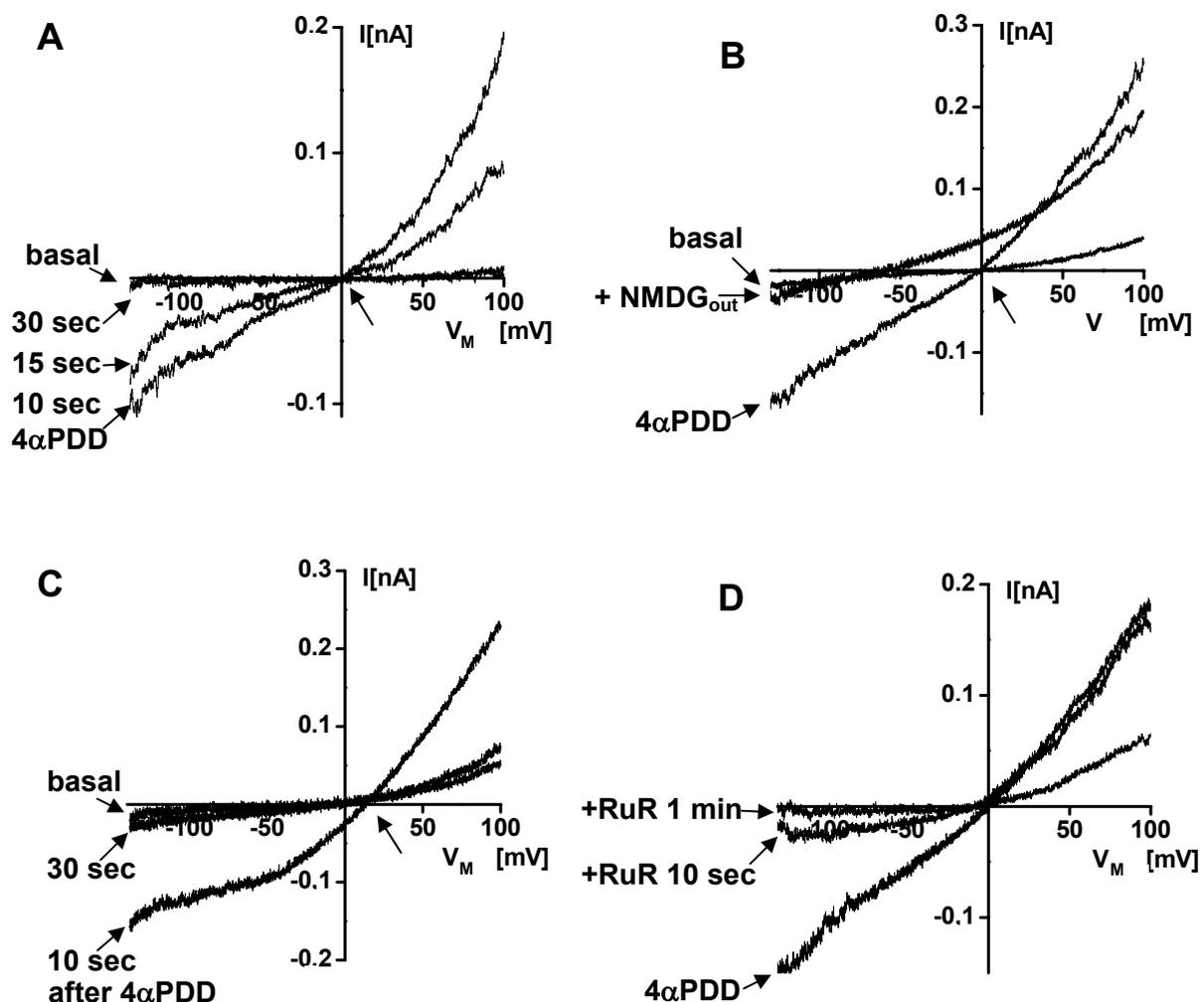


Abb. 3-2: TRPV4-Ströme in nativen Endothelzellen der *Arteria Carotis Communis* (RCAEC) der Ratte. Ganzzelleableitungen in **A** mit 1 mmol/l $[Ca^{2+}]_{out}$, **B** nach Kationensubstitution mit $NMDG^+$, **C** nach Kalziumpufferung ($[Ca^{2+}]_{out} = 20 \text{ nmol/l}$) und **D** TRPV4-Blockade mit $1 \mu\text{mol/l}$ RuR.

Die Kanalblockade erwies sich als spannungsabhängig und resultierte zunächst in einer raschen Abnahme des Einwärtsstroms (≤ 20 sec nach RuR-Inkubation). Längere Inkubationszeiten führten zu einer Abnahme des Auswärtsstroms. RuR ist membranpermeabel und wirkt von der intrazellulären Seite des Kanals, so dass die Untersuchungen zur Wirksamkeit dieses lipophilen Kanalblocker in der *whole-cell* Konfiguration durchgeführt werden konnten. In dem in Abb. 3-2. D gezeigten Experiment

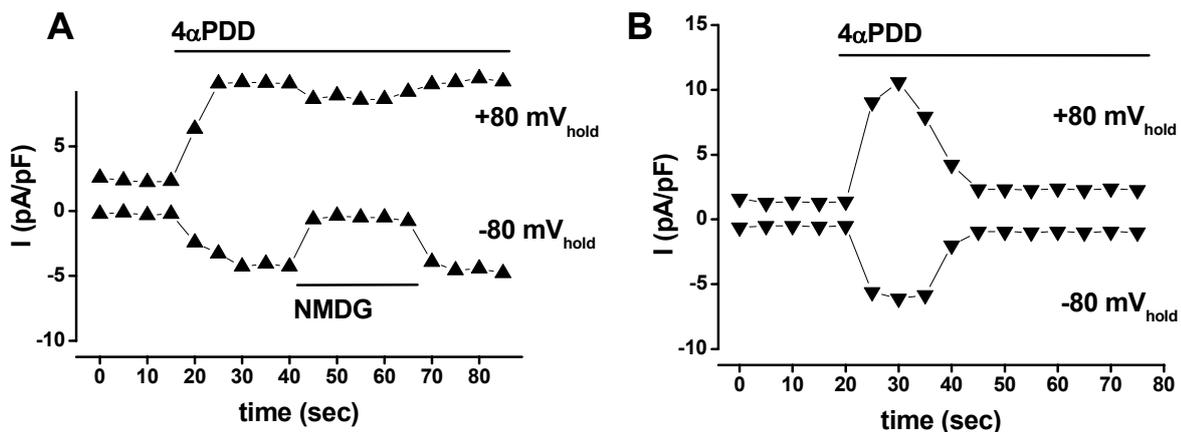


Abb. 3-3: zeitlicher Verlauf 4 α PDD-induzierter Ströme in nativen Endothelzellen der *A. Carotis Communis* der Ratte (RCAEC) bei positiven und negativen Haltepotentialen. **A** nach Kalziumpufferung ($[Ca^{2+}]_{out} = 20$ nmol/l) und **B** mit 1 mmol/l $[Ca^{2+}]_{out}$.

fürhte die Zugabe von 1 μ mol/l RuR zur vollständigen Blockade der 4 α PDD-aktivierten TRPV4-Kanäle. Eine vollständige Blockade des Kanals konnte zusätzlich in einer Reihe von Experimenten bereits bei Konzentrationen von 500 nmol/l (n=4) oder 250 nmol/l (n=5) RuR beobachtet werden. Ein vollständige Kanalblockade konnte auch durch die Zugabe von Gadolinium (50 nmol/l, n=3) erreicht werden.

Als weitere Stimuli für TRPV4 werden niedrige pH-Werte, hypoosmotische Verhältnisse zwischen Intra- und Extrazellulärraum und moderate Hitze (27 - 40°C) beschrieben (Nilius, 2003). Untersuchungen an isolierten Endothelzellen der thorakalen Rattenaorta zeigten TRPV4-medierte Ströme nach Reduktion des pH-Wertes der Badlösung auf 6,0, sowie nach Reduktion der Osmolarität um 30%. Erhöhung der Temperatur führte ebenfalls zu einer moderaten Aktivierung von TRPV4, welche bei 37°C maximal war. Sämtliche durch diese Stimuli aktivierten Ströme erwiesen sich als RuR-sensitiv.

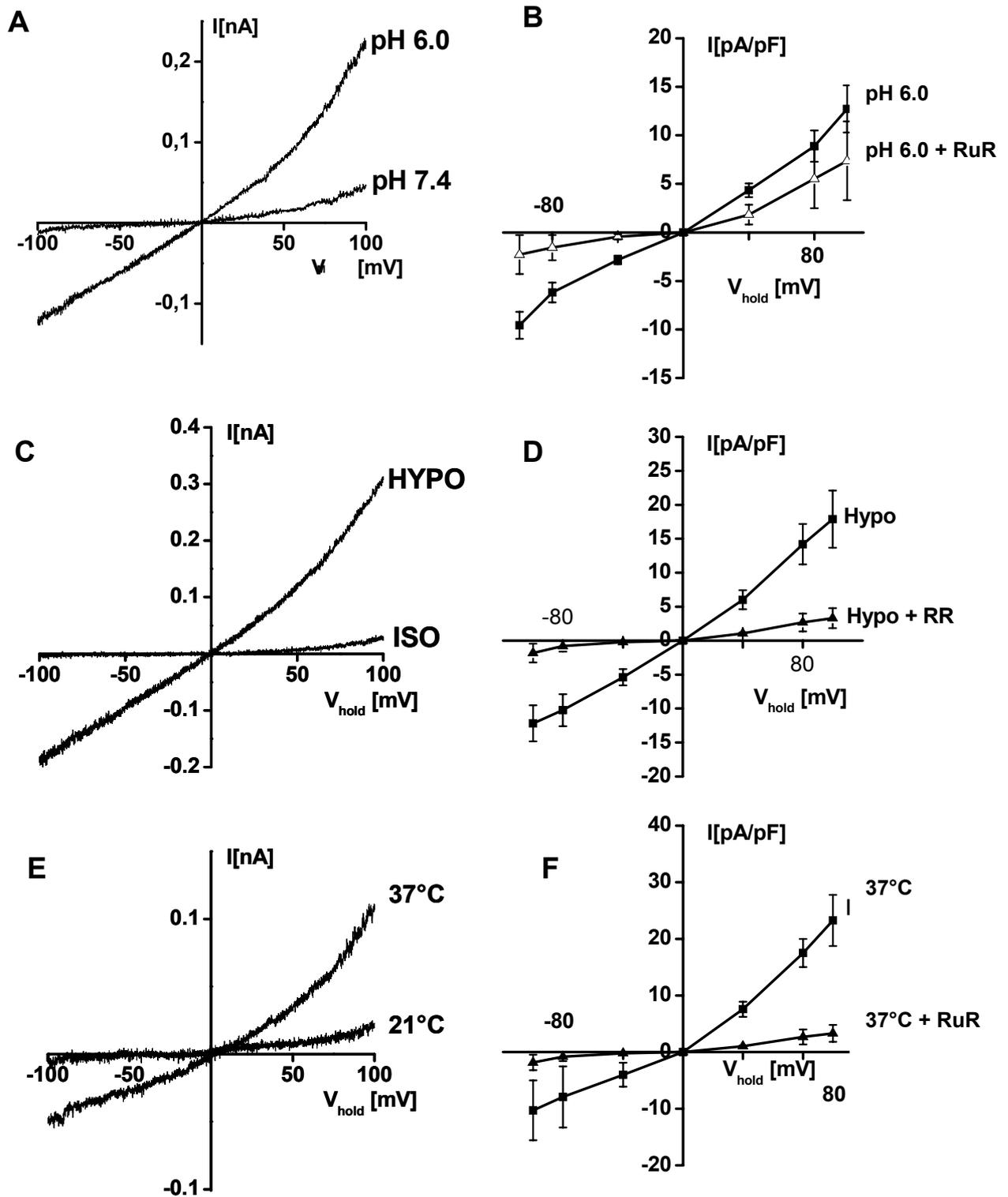


Abb. 3.4: TRPV4-medierte Ströme in nativen Endothelzellen der *A. Carotis Communis* der Ratte (RCAEC). Aktivierung erfolgte durch verschiedene chemische und physikalische Stimuli. **A:** Ganzzelleableitungen nach Aktivierung durch Reduzieren des pH-Wertes (7,4 → 6,0), **B:** Reduktion der Osmolarität um 30% und **C:** moderater Erwärmung der Badlösung (21 → 37 °C). **B, D** und **F:** entsprechende gesamt-Kanalleitfähigkeit der untersuchten Zellen.

3.2.3 Modulation des Membranpotentials nach pharmakologischer Aktivierung von TRPV4

Aktivierung von TRPV4 führt zu einem Einstrom von Ca^{2+} und Na^{+} in das Zytosol und damit sowohl zu einer Depolarisation der Membran als auch zu einer Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Beide Signale können in Endothelzellen zu einer Aktivierung verschiedener Kationenkanäle, wie z.B. kalziumaktivierbarer Kationenkanälen (I_{CRAC}), kalziumaktivierbarer Chloridkanälen und kalziumaktivierbaren Kaliumkanäle des IK, SK oder BK-Typs, führen. Die Aktivierung dieser Kanäle führt zu weiteren Änderungen des Membranpotentials (Kohler, 2000). Endothelzellen zeigen nach Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ um Werte über 500 nmol/l einen biphasischen Verlauf des Membranpotentials. Auf eine initiale peakartige Depolarisation folgt eine lang anhaltende Phase der Hyperpolarisation, welche auf der Aktivierung von kalziumaktivierbaren Kaliumkanälen beruht (Hoyer, 1997) und welche die elektrochemische Triebkraft für den Kalziumeinstrom bereitstellt. In *current-clamp* Messungen wurde der Verlauf des Membranpotentials in RCAEC nach Stimulation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ 4aPDD untersucht. Unter physiologischen Kalziumkonzentrationen führte die Aktivierung des Kanals zu einer initialen Depolarisation ($\Delta V_m \approx 7 \text{ mV}$) auf die eine moderate 30 – 60 sec anhaltende Hyperpolarisation ($\Delta V_m \approx -6 \text{ mV}$) folgte. Wie in Abbildung 3-5 A und B dargestellt, erwies sich dieser biphasische Verlauf des Membranpotentials als von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig. Nach Kalziumpufferung auf 20 nmol/l konnte keine Hyperpolarisation der Zelle beobachtet werden. Demgegenüber konnte in vergleichenden Experimenten sowohl unter physiologischen Kalziumkonzentrationen als auch nach Kalziumpufferung ein starkes hyperpolarisierendes Zellpotential nach Stimulation mittels ACh erreicht werden. Es ist festzuhalten, dass die pharmakologische Aktivierung von TRPV4 und der damit einhergehende Einstrom von Ca^{2+} und Na^{+} in das Zytosol geringe Auswirkung auf das Zellpotential hat und die Kanalaktivität von der extrazellulären Kalziumkonzentration abhängig ist.

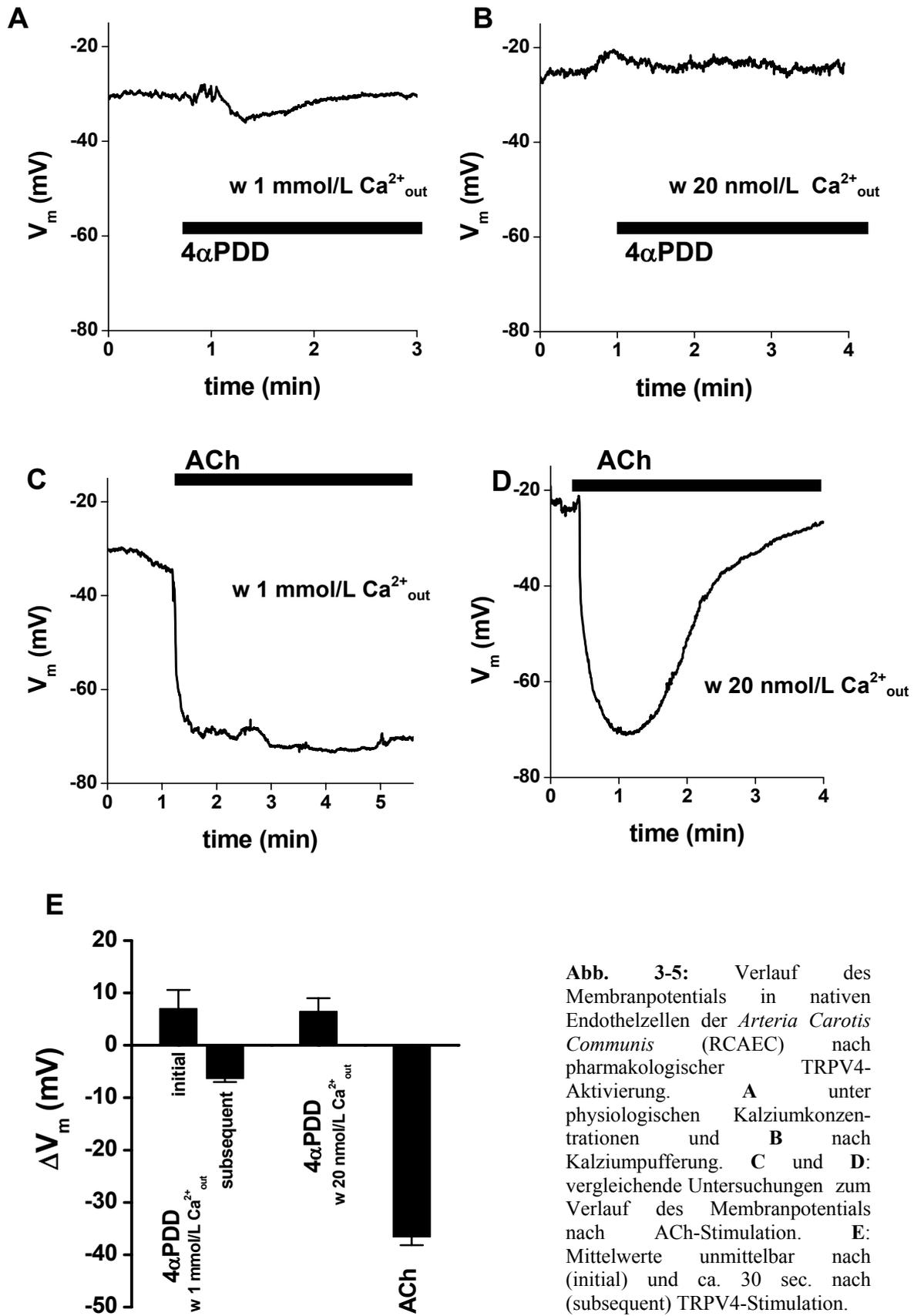


Abb. 3-5: Verlauf des Membranpotentials in nativen Endothelzellen der *Arteria Carotis Communis* (RCAEC) nach pharmakologischer TRPV4-Aktivierung. **A** unter physiologischen Kalziumkonzentrationen und **B** nach Kalziumpufferung. **C** und **D**: vergleichende Untersuchungen zum Verlauf des Membranpotentials nach ACh-Stimulation. **E**: Mittelwerte unmittelbar nach (initial) und ca. 30 sec. nach (subsequent) TRPV4-Stimulation.

3.3 Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration nach pharmakologischer Aktivierung von TRPV4

Die Quantifizierung des TRPV4-mediierten Kalziumeinstroms mittels der FURA II-Technik erfolgte an isolierten Endothelzellen der thorakalen Aorta der Ratte (RAEC). RAEC zeigen nach Stimulation mit 4aPDD, niedrigem pH-Wert, Hitze und verminderter Osmolarität zu den RCAEC identische TRPV4-Ströme und wurden für diese Untersuchungen aus technischen Gründen vorgezogen.

Pharmakologische TRPV4-Aktivierung mittels 4aPDD führte unter physiologischen Kalziumkonzentrationen (1 mmol/l) zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ um 140 nmol/l (SED 60 ± 5 nmol/l, $n \geq 50$) (siehe Abb. 3-6). Eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ trat nach starker Kalziumpufferung ($[Ca^{2+}]_{out} = 20$ nmol/l) oder Zugabe von 1 μ mol/l RuR in das Badmedium nicht mehr auf. Substitution des extrazellulären Ca^{2+} durch Mn^{2+} führte nach TRPV4-Aktivierung zu der als Mn^{2+} -quenching bekannten Reduktion der FURA2-Fluoreszenzintensität. Reduktion des pH-Wertes (pH 6.0) und der Osmolarität führten ebenfalls zu einem RuR-sensitiven Kalziumeinstrom. Stimulation durch Hitze (21°C – 37°C) erbrachte hingegen einen vergleichsweise geringen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ (Daten nicht gezeigt). Eine IP_3 -vermittelte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, wie sie nach Stimulation mit 1 μ mol/l ACh beobachtet wurde (Abb. 3-6 E), geht mit einem dramatischen peakartigen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf Werte ≥ 600 nmol/l und einer anschließenden Plateauphase, welche auf die Aktivierung von Rezeptor- oder Sekundärbotenstoff-aktivierter Kalziumkanäle beruht, einher. Im Einklang mit den elektrophysiologischen Untersuchungen, in welchen keine massive Hyperpolarisation des Zellpotentials beobachtet wurde, ist der moderate TRPV4-medierte Kalziumeinstrom nicht mit der Agonisten- bzw. IP_3 -induzierten Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speicherorganellen zu vergleichen. Die massive Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führt im Zytosol zu Formationen von so genannten Ca^{2+} -waves und -sparks und ist von submembranösen Konzentrationsanstiegen infolge der Öffnung weniger kalziumpermeabler Ionenkanäle in der Zellmembran abzugrenzen.

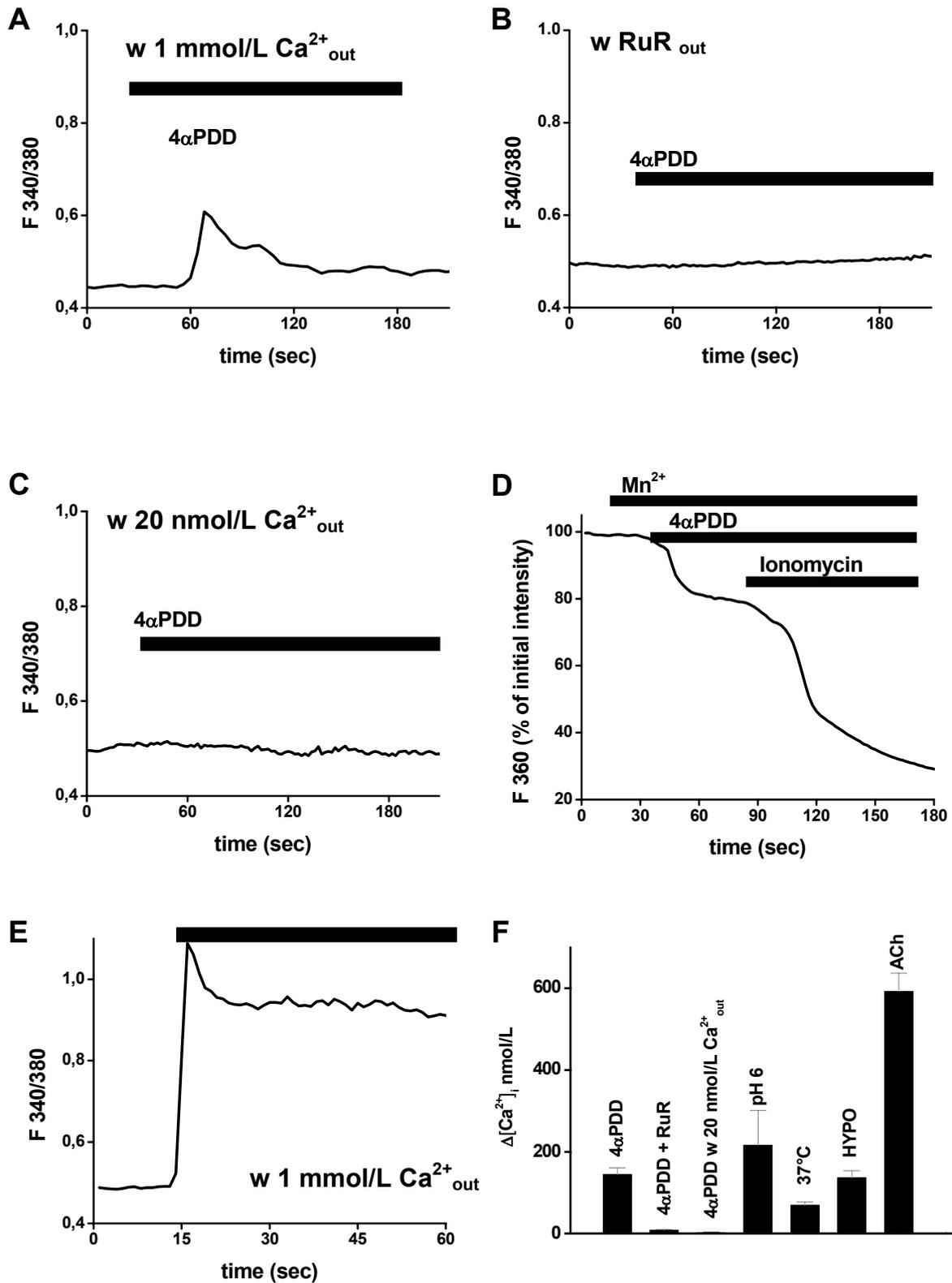


Abb. 3-6: Modulation der $[Ca^{2+}]_i$ in isolierten Endothelzellen der thorakalen Aorta der Ratte (RAEC). **A** pharmakologische TRPV4-Aktivierung unter physiologischer $[Ca^{2+}]_{out}$ (1 mmol/l) und **C** nach Ca^{2+} -Pufferung ($[Ca^{2+}]_{out} = 20$ nmol/l), **B** nach TRPV4-Inhibierung durch 1 μ mol/l RuR. **D** Mn^{2+} -Quenching, **E** vergleichende ACh-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, **F** Mittelwerte des TRPV4-induzierten Ca^{2+} -Einstroms.

3.4 Funktionelle Bedeutung von TRPV4 in der Endothel-vermittelten Vasoregulation

Durch die Freisetzung endokriner Substanzen sind Endothelzellen wesentlich an der Modulation des Kontraktionszustandes der glatten Gefäßmuskulatur und damit an der Anpassung des Gefäßtonus an die jeweiligen hämodynamischen Gegebenheiten beteiligt (vgl. Abschnitt 1.2). Insbesondere endotheliale Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle und Ca^{2+} -aktivierbare K^+ -Kanäle scheinen über die Steuerung der intrazellulären Ca^{2+} -Signalgebung wesentlich an der Regulation der Endothelfunktion beteiligt zu sein. Insofern kommt diesen Kanälen in der Endothel-vermittelten Vasoregulation eine Schlüsselfunktion zu. Im Rahmen dieser Studie wurde in einer Reihe von vaskulär-biologischen Experimenten die Beteiligung von TRPV4 an der endothelialen Vasoregulation untersucht. Hierzu wurden isolierte Segmente der *Arteria Carotis Communis* (ACC) und der *Arteria Gracilis* der Ratte in einem Druckmyographen unter physiologischen Bedingungen perfundiert und Testsubstanzen intravasal appliziert.

Die intraluminale Applikation von 4 α PDD führte in orientierten Druckmyographexperimenten an der ACC der Ratte zu einer dosisabhängigen Vasodilatation ($K_d = 0,3 \mu\text{mol/l}$). Applikation von Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{mol/l}$ resultierten in einer maximalen Gefäßdilatation von 80% (gemessen vom Niveau der initialen Kontraktion). Die Dilatation erwies sich als strikt Endothel-abhängig. Nach Denudation des Gefäßes oder extrazellulärer Applikation von 4 α PDD wurde kein vasoregulativer Effekt beobachtet.

Die kombinierte intravasale Applikation von 4 α PDD und RuR verhinderte eine Dilatation des Gefäßes. Perfusion des Gefäßes mit RuR übte per se keinen Effekt auf den myogenen Tonus aus, so dass eine konstitutive TRPV(4)-Aktivität unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden kann. Ebenso wurde kein Effekt von RuR auf die Agonisten-induzierte Vasodilatation beobachtet.

Da die endothel-abhängige Vasodilatation NO-, PGI₂- oder EDHF-vermittelt ist, galt es die Beteiligung dieser drei Systeme an der TRPV4-induzierten Vasodilatation zu untersuchen. Vorinkubation des Gefäßes mit L-NNA

und/oder Indomethacin führt zu einer selektiven Inhibierung der eNOS bzw. der COX1. Demnach kann eine Endothel-abhängigen Vasodilatation unter diesen Bedingungen, wie sie beispielsweise nach Applikation von ACh oder infolge der selektiven Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger K^{+} -Kanäle mittels 1-EBIO auftritt, ausschließlich EDHF-mediiert sein (vgl. Abschnitt 1.2). Eine signifikante EDHF-vermittelten Vasodilatation konnte nach intravasaler Perfusion mit 4 α PDD in der ACC nicht beobachtet werden. Die 4 α PDD-induzierte Dilatation der ACC erwies sich als L-NNA-sensitiv und ist somit auf die NO-vermittelte Vasodilatation zurückzuführen.

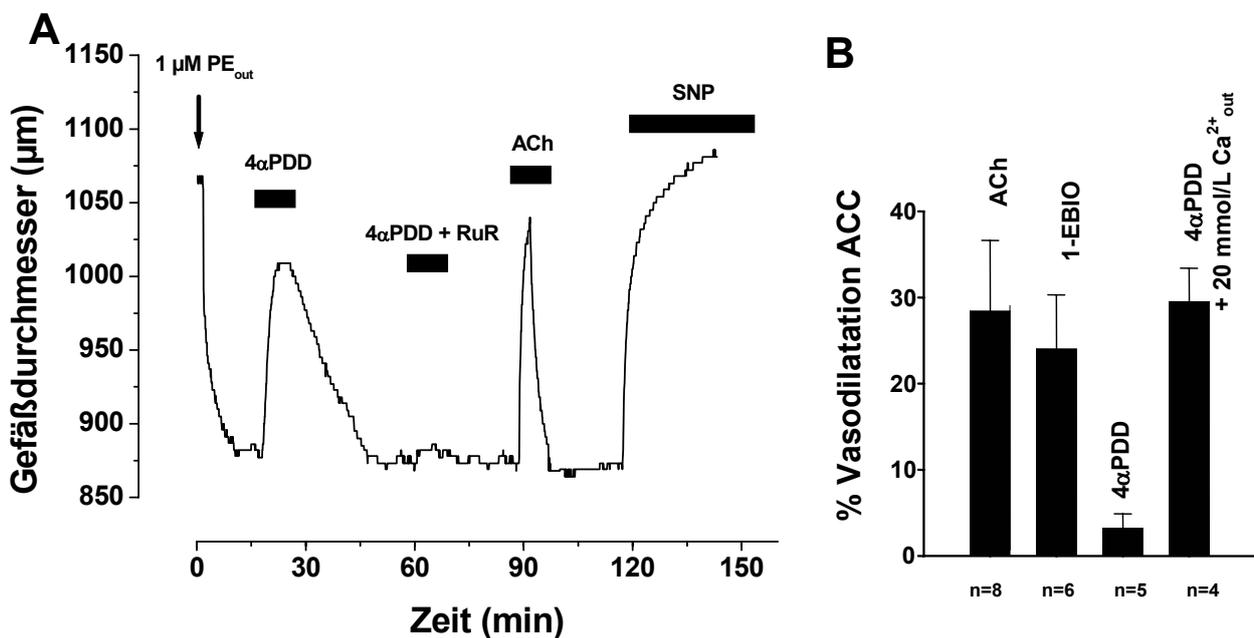


Abb. 3-7a: Ergebnisse der vaskulär-biologischen Untersuchungen am Druckmyograph der A. carotis communis der Ratte. **A** Dilatation nach pharmakologischer TRPV4-Aktivierung, Kanalblockade mittels Ruthenium Red und vergleichende Dilatation nach intraluminaler Zugabe von ACh. **B** 4 α PDD Mittelwerte der EDHF-mediierten Dilatation.

3.4.1 Mechanosensitive Eigenschaften von TRPV4

Jedes durch einen geometrisch definierten Körper fließendes Fluid wirkt an der Grenzfläche eine friktionale Kraft, die so genannte Scherkraft, auf diesen Körper aus. In Abhängigkeit von u.a. der Geometrie des durchströmten Körpers, des Volumenstroms und den rheologischen Eigenschaften des Fluids kann diese aus dem Hagen-Poiseuillschen-Gesetz abgeleitet und berechnet werden. In einem Kreisrohr wie einem Gefäß ist die

Schubspannungsverteilung immer linear und unabhängig von den Fließbedingungen. An der Rohrwand ist sie maximal.

Die auf die Oberfläche des Endothels wirkende Wandschubspannung wird als wichtiger physikalischer Stimulus im Zusammenhang mit zahlreichen vaskulären Ereignissen betrachtet (Lehoux, 2006; Esper, 2006; Oechslin, 2005). In Arteriolen führt eine Erhöhung der Wandschubspannung zur Freisetzung endogener Faktoren wie NO, vasodilatatorischen Prostanoiden und EDHF. Der genaue Mechanismus dieser fluß-induzierten Vasodilatation ist nicht geklärt. Es wird postuliert, dass endotheliale mechanosensitive Ionenkanäle über eine durch Verformung der zytoskeletalen Strukturen

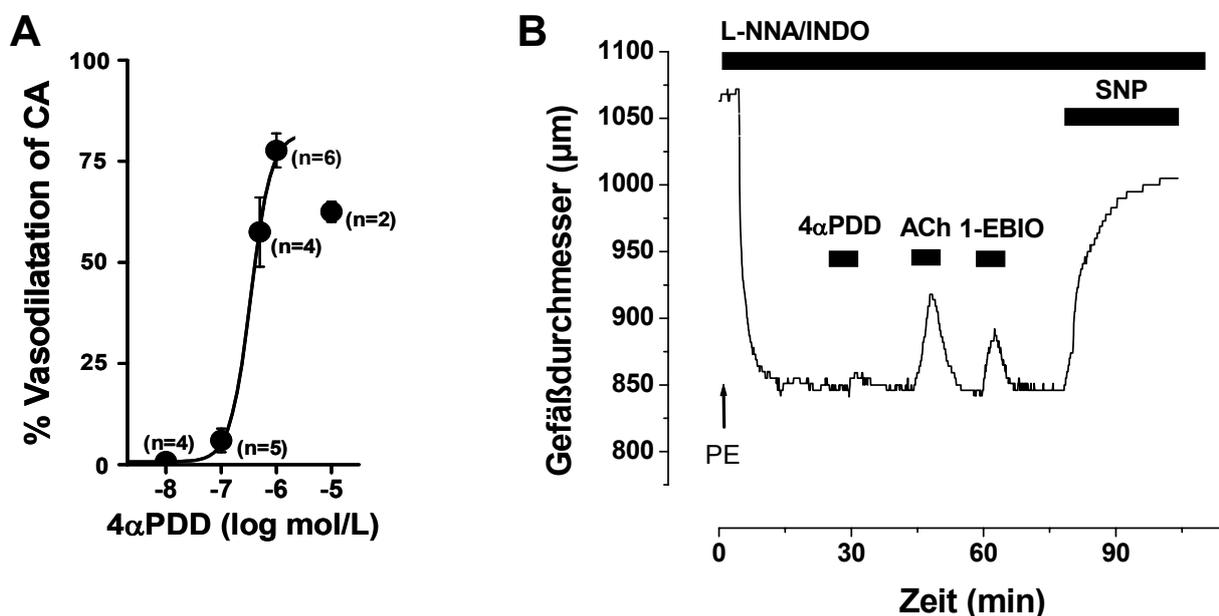


Abb. 3-7: **A** Dosis-Wirkungs Beziehung der 4αPDD-induzierten Vasodilatation. **B** EDHF-medierte Dilatation nach Inhibierung der eNOS und der COX-1 mittels L-NNA und Indomethacin.

bedingten Konformationsänderung aktiviert werden können (Hoyer, 1997).

Die elektrophysiologische Untersuchung mechanosensitiver Ionenkanäle erfolgte in den meisten Studien über das Anlegen positiver oder negativer Pipettendrücke auf die Zellmembran. Diese Art der Stimulation ist jedoch physikalisch weder mit dem intravasal herrschenden Blutdruck, noch mit der durch den Blutfluss ausgeübten Wandschubspannung gleichzusetzen (Morris, 1990; Sigurdson, 1993; Davies, 1995; Sackin, 1995).

TRPV4 wird aufgrund der Sensitivität auf osmotische Veränderungen, welche zu einem Anschwellen der Zelle und somit zu einer Dehnung der

Membranstruktur führen, als putativer mechanosensitiver Kanal in verschiedenen Zelltypen beschrieben (Liedtke, 2005). Ob TRPV4 an der Mechanosensitivität des Endothels und an der mit einer Erhöhung der Wandschubspannung (WSS) einhergehenden Vasodilatation beteiligt ist, wurde bislang nicht untersucht.

Bei den intrazellulären Prozessen, die an der endothelialen Mechanotransduktion beteiligt sind, kann, in Analogie zur Signaltransduktion nach Agonistenstimulation, die intrazelluläre Kalziumkonzentration als der zentrale, die verschiedenen Signale integrierender intrazellulärer Botenstoff angesehen werden. *Shear stress* bzw. erhöhte Flußraten führen zu einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-

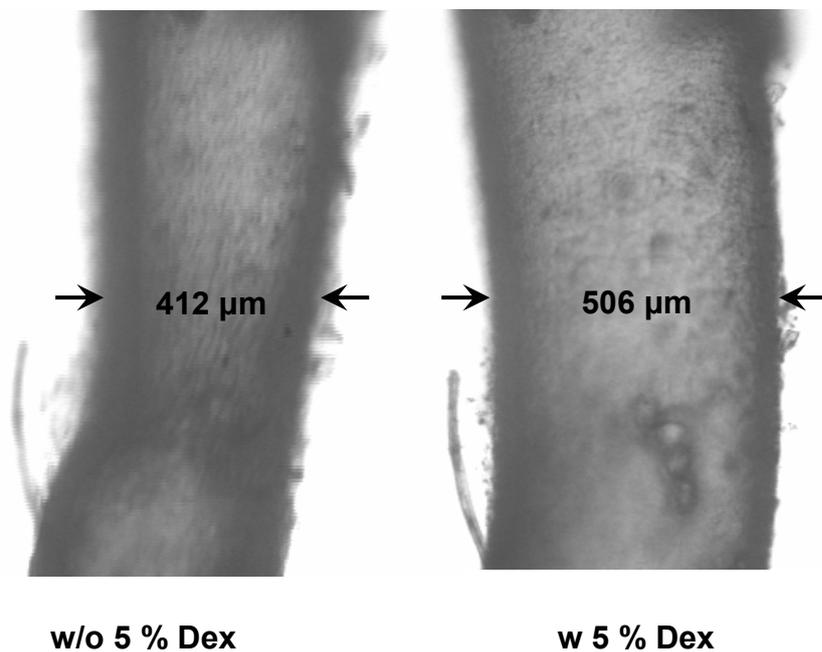
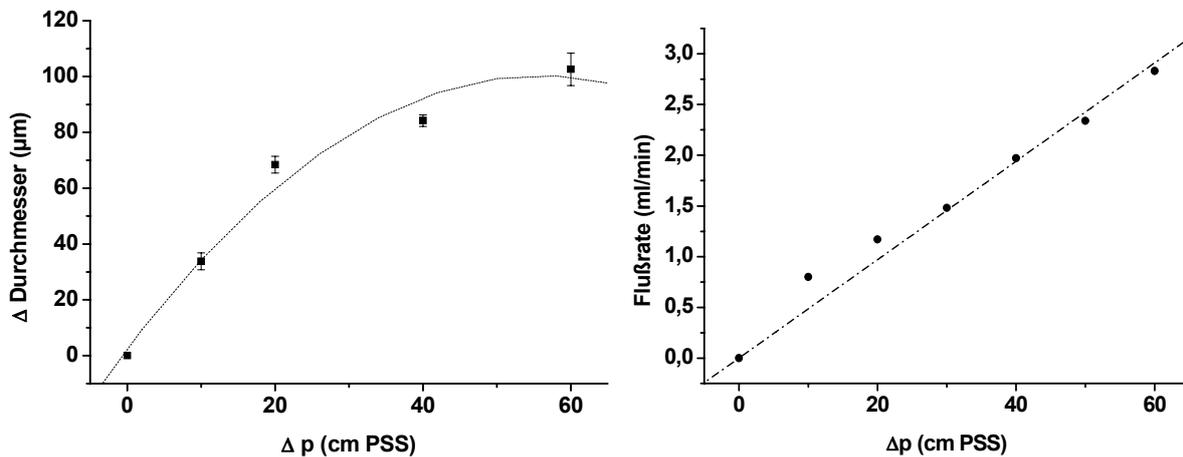


Abb. 3-8: (oben) Einfluß der Flußrate (angegeben in Druckdifferenz zwischen Zu- und Ablauf) auf den Gefäßdurchmesser der A. carotis comunis bei konstantem intravasalem Druck von 80 cm/PSS. (links) Aufnahmen einer perfundierten A. gracilis. Erhöhung der Viskosität des Perfusionsmediums durch Zugabe von 5 % (w/v) Dextran führt zur Fluß-induzierten Vasodilatation.

konzentration (Mo, 1991; Geiger, 1992; Falcone, 1993), wofür der Einstrom von extrazellulärem Kalzium notwendig ist. Erhöhte Flussraten bzw. Erhöhte WSS führen im Endothel zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Nilius, 2003; Andrade, 2005; Strotmann, 2000). Hierfür sind der Einstrom von extrazellulärem Kalzium und/oder die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern notwendig. Beide Mechanismen werden bei mechanischer Stimulation sowohl von kultivierten Endothelzellen (Helmlinger, 1996; Hoyer, 1998) als auch von perfundierten Gefäßen mit intaktem Endothelzellverband diskutiert (Falcone, 1993). Da die Pufferung extrazellulären Kalziums sowie die unselektive Kanalblockade mittels Gd^{3+} den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach mechanischer Stimulation verhindert (Hoyer, 1998).

In Experimenten am Druckmyograph konnte innerhalb dieser Arbeit über die stufenweise Vergrößerung der Druckdifferenz und der damit einhergehenden Erhöhung des Volumenstroms bzw. der Flussrate des perfundierenden Mediums bei gleich bleibendem mittlerem, intravasal herrschendem Druck von 80 cm/PSS eine Erhöhung der WSS erreicht und eine flussinduzierte Vasodilatation ausgelöst werden.

Da auch die rheologischen Eigenschaften des Blutes von großer medizinischer Bedeutung sind (Romano, 2006) und eine Zunahme der Viskosität linear die WSS erhöht, wurde in einer Reihe von Experimenten der Einfluss von 5 % Dextran (w/v) auf die *shear stress* induzierte Vasodilatation an der ACC der Ratte untersucht. In vorangegangenen viskosimetrischen Messungen wurde eine Erhöhung der Viskosität einer PSS/Dextran-Lösung von 0,7 cP (PSS w/o Dextran) auf 1,8 cP (PSS w 5 % Dextran) festgestellt. Die Perfusion der ACC unter Zusatz von Dextran führte entsprechend zu einer WSS-induzierten Vasodilatation und konnte, ebenso wie die fluss- bzw. volumenstrom-induzierte Dilatation, durch Zugabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ RuR fast vollständig unterdrückt werden.

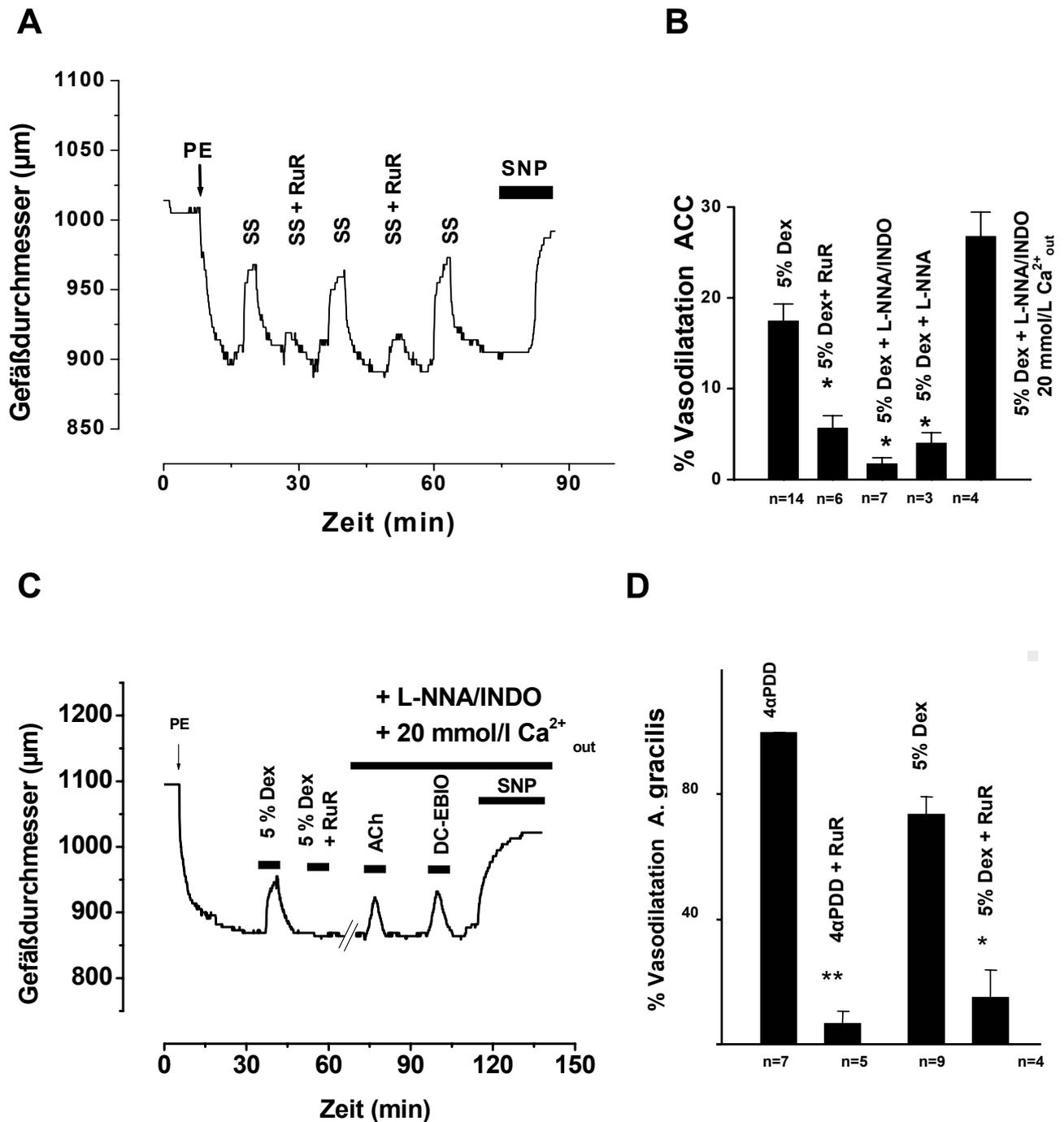


Abb. 3-9: Flussinduzierte Vasodilatation an der *Arteria Carotis Communis* der Ratte. Über Erhöhung der Perfusionsrate (A, SS = Shear Stress) bzw. Erhöhung der Viskosität des Perfusionspuffers (C) kann eine WSS-induzierte Vasodilatation ausgelöst werden. (B) Die flussinduzierte Vasodilatation ist RuR-sensitiv und im Wesentlichen NO-vermittelt, kann jedoch nach Inhibierung der eNOS bzw. COX durch Applikation von unphysiologisch hohen Ca^{2+} -Konzentrationen potentiert werden. (D) In typischen Widerstandsgefäßen wie der *A. gracilis* ist die 4 α PDD- und WSS-induzierte Vasodilatation der in der ACC vergleichbar.

3.4.2 TRPV4-Funktion und Expression bei genetisch determinierter Hypertonie

Ein wichtiger Teil der endothelialen Dysfunktion bei essentieller oder arterieller Hypertonie betrifft die fluss- oder *shear stress*-induzierte Vasodilatation. Diese ist bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Vergleich zu normotensiven Wistar-Kyoto-Tieren (WKY) vermindert (Koller, 1994 & 1995). Da TRPV4 in den vorangegangenen Untersuchungen dieser Studie als mechanosensitiver Kanal im Endothel der Ratte identifiziert wurde, erschien es sinnvoll die Funktion und Expression von TRPV4 am Hypertoniemodell zu untersuchen.

Sämtliche vaskulär-biologischen Untersuchungen der SHR und WKY-Tiere erfolgten zwischen der 14. – 18. Lebenswoche. Ab der 10. Lebenswoche beginnen die SHR-Tiere einen spontanen Hypertonus zu entwickeln, welcher ab der 14. Lebenswoche maximal ausgeprägt ist. Entsprechend lagen die Blutdruckwerte der SHR-Tiere mit 156 ± 12 mm/Hg ($n = 25$) deutlich über denen normotensiver WKY-Tiere mit 116 ± 14 mm/Hg ($n = 30$). In Experimenten am Druckmyograph zeigten SHR-Tiere eine deutlich verminderte flussinduzierte Vasodilatation ($16 \pm 4,8$ % SEM, $n = 6$) im Vergleich zu WKY-Tieren ($46 \pm 6,7$ % SEM, $n = 7$). Weniger ausgeprägt

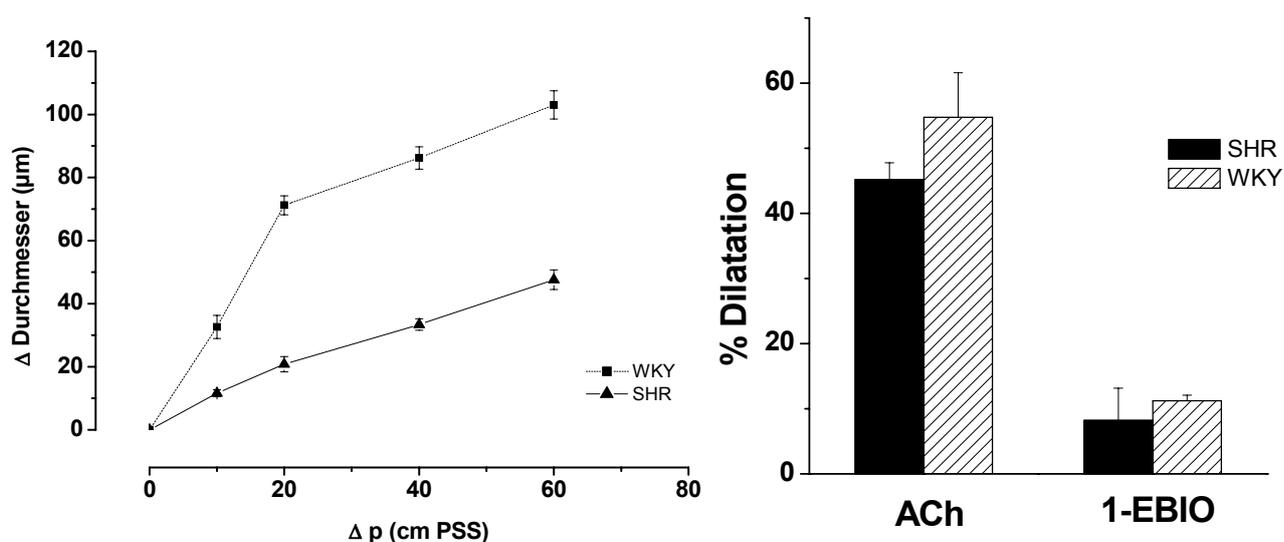


Abb. 3-10: (links) Flussinduzierte Vasodilatation der ACC von SHR- und WKY-Tieren. (rechts) Agonisten-induzierte Vasodilatation.

waren die Unterschiede in der Agonisten-induzierten Vasodilatation. Perfusion mit 1 $\mu\text{mol/l}$ ACh führte in Gefäßen von SHR-Tieren zu einer Dilatation von $45 \pm 3,2$ % SEM, $n = 5$, welche sich als geringfügig niedriger als die der WKY-Tiere ($55 \pm 9,7$ % SEM, $n = 4$) darstellte. Applikation von 1-

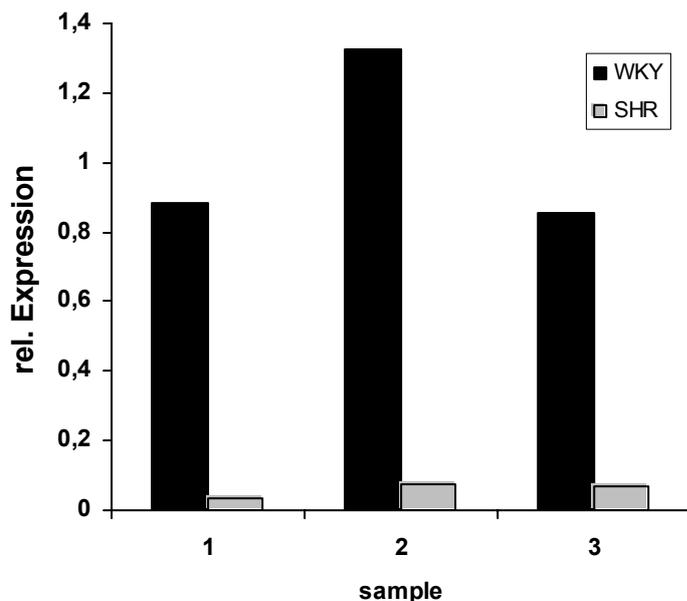


Abb. 3.10: quantitative Bestimmung der TRPV4-Expression in SHR- und WKY-Tieren.

EBIO führte in Gefäßen der SHR-Gruppe zu einer EDHF-vermittelte Vasodilatation von $8,2 \pm 4,9$ % SEM, $n = 5$ (WKY $11,3 \pm 0,8$ % SEM, $n = 4$). Demnach ist die Progression der endothelialen Dysfunktion im Bezug auf die Agonisten-induzierte Vasodilatation als wenig ausgeprägt zu bezeichnen. Als

signifikant stellten sich die Unterschiede in der flussinduzierten

Vasodilatation beider Gruppen dar. Während die ACC der WKY-Tiere auf eine stufenweise Erhöhung der intravasalen Perfusionsrate (stufenweise Erhöhung der Druckdifferenz von 20 auf 60 cm/PSS) mit einer maximalen Dilatation von $100 \mu\text{m} \pm 12 \mu\text{m}$ reagierten, war diese in der SHR-Gruppe drastisch reduziert ($43 \mu\text{m} \pm 7 \mu\text{m}$). Während normotensive WKY-Tiere auf Stimulation mit 4 α PDD mit einer den SD-Tieren vergleichbaren starken Vasodilatation von bis zu 80% reagierten, zeigte die Carotis von hypertensiven SHR-Tieren keine Vasoreaktion nach pharmakologischer TRPV4-Aktivierung. Entsprechend vermindert war die fluss- bzw. WSS-induzierte Dilatation. Quantifizierung der endothelialen TRPV4-Expression ergab eine stark reduzierte TRPV4-Expression in hypertensiven SHR im Vergleich zu normotensiven WKY-Tieren. Die Bildung des Mittelwertes von jeweils drei mRNA-Proben zeigte nach Normierung auf die endogene Referenz

(GAPDH) eine dramatisch Verminderte Expression von TRPV4 der SHR-Gruppe im Vergleich zu den WKY-Tieren. Demnach könnte die Exposition der aufgrund des Bluthochdrucks erhöhten WSS auf das Endothel einen direkten Einfluss auf die TRPV4-Expression haben und zu einer verminderten funktionalen Expression des Kanals führen. Inwiefern die Erhöhte WSS bei arterieller Hypertonie die Kanalexpression reprimiert bleibt jedoch unklar.

4. Diskussion

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen nach wie vor zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Funktionsstörungen in der Gefäßwand sind bei diesen Krankheiten oft als initiale pathophysiologische Mechanismen festzustellen. Die Charakterisierung der gestörten Signalwege und der zellulären und molekularen Interaktionen zwischen Zellen der Gefäßwand ist in vielen Fällen unklar und kann einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Ursachen kardiovaskulärer Erkrankungen leisten. Von besonderer klinischer Bedeutung ist die Endothelfunktion, welche innerhalb der letzten Jahre für viele Risikofaktoren und Gefäßerkrankungen intensiv untersucht worden ist. Unter klinischen Gesichtspunkten sind die verschiedenen molekularen Ursachen von pathogenen Gefäßalterationen, welche zu einer endothelialen Dysfunktion führen, bei praktisch allen kardiovaskulären Risikofaktoren mit einer verminderten NO-Verfügbarkeit assoziiert. Die Endotheldysfunktion ist in der Regel nicht auf eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation beschränkt, sondern betrifft ebenso die Regulation der Leukozytenadhäsion und -infiltration, sowie der Thrombozytenadhäsion und -aggregation, was zu einem proinflammatorischen und prothrombotischen Phänotyp führt.

Endotheliale Schlüsselfunktionen, wie die Freisetzung von NO, PGI₂ und EDHF sind Ca²⁺-reguliert. Die intrazellulären Ca²⁺-Mobilisierung kann im Endothel über die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern des ER oder über die Aktivierung Ca²⁺-permeable Kationenkanäle erfolgen. Die Charakterisierung der Ca²⁺-permeablen Kationenkanäle am Endothel ist bislang unzureichend. Es gibt einzelne indirekte Hinweise darauf, dass die Funktion der die Ca²⁺-Homöostase regulierenden Ionenkanäle bei

Angiogeneseprozessen eine Rolle spielen könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Vertreter der TRP-Kationenkanäle im Endothel funktional exprimiert und in die Kalziumhomöostase involviert sind und ob diese Kanäle bei pathophysiologischen Prozessen wie der arteriellen Hypertonie eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Studie wurden elektrophysiologische und vaskulär-biologische Untersuchungen an Gefäßpräparaten mit intaktem Endothel durchgeführt. Durch die Kombination von *patch-clamp* und *single-cell RT-PCR* Untersuchungen an morphologisch intaktem Endothel konnte ein kalziumpermeabler, nicht-selektiver Kationenkanal der TRPV-Familie identifiziert werden, der aufgrund seiner Kalziumleitfähigkeit an der Endothel-vermittelten Vasodilatation beteiligt ist. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an isolierten Endothelzellen wurde festgestellt, dass die pharmakologische und physikalische Stimulation von TRPV4 zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ führt, welche über die Aktivierung der eNOS und nachfolgender NO-Freisetzung eine Vasodilatation an isolierten Segmenten der ACC auslösen kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TRPV4 an der flussinduzierten Vasodilatation beteiligt ist und als endothelialer Mechanosensor für hämodynamische Veränderungen fungieren kann. Untersuchungen an hypertensiven SHR-Ratten ergaben eine stark reduzierte TRPV4-Funktion und Expression im Vergleich zu normotensiven WKY-Tieren. Insgesamt konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der Ionenkanal TRPV4 den bei der endothelialen Mechanotransduktion wichtigen intrazellulären Kalziumeinstrom ermöglicht und somit die Vasoreaktion auf hämodynamische Veränderungen regulieren kann. Anhand der Untersuchungen am Hypertoniemodell kann davon ausgegangen werden, dass TRPV4 eine Bedeutung in der mit dem Krankheitsbild der Hypertonie einhergehenden endothelialen Dysfunktion zukommt.

4.1 Endotheliale TRPV4

Obwohl TRPV4 zunächst als rein osmosensorischer Kanal beschrieben wurde, erbrachte die intensive Forschungstätigkeit von Nilius und anderen Arbeitsgruppen, dass auch andere physikalische Stimuli TRPV4 aktivieren können. Insbesondere die Entdeckung des synthetischen Agonisten 4 α PDD erbrachte großen Fortschritt in der funktionalen Charakterisierung des Kanals. Der Phorbol-Ester 4 α PDD führt zu einer starken, direkten und spezifischen Aktivierung von TRPV4 (Nilius, 2003). Das nahe verwandte Phorbol-Derivat PDDHV, ein potenter Aktivator von TRPV1, führte in *inside-out patches* hingegen nicht zu einer TRPV4-Aktivierung (Nilius, 2003) und auch die Stimulation mittels des strukturell sehr ähnliche PKC-Aktivators PMA in TRPV4-transfizierten HEK-293 Zellen hatte keinen aktivierenden Effekt.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals, welche innerhalb dieser Arbeit nach 4 α PDD-Applikation am intakten Endothel der ACC gemessen wurden, stimmen mit den Daten von anderen Arbeitsgruppen hinsichtlich Kinetik, Selektivität und Leitfähigkeit gut überein (Nilius, 2004; Watanabe, 2003, Voets, 2002). Obwohl die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen in den meisten Fällen an TRPV4-überexprimierenden Zellkulturen durchgeführt wurden und Daten von elektrophysiologischen Messungen am intakten Endothel nicht vorliegen, ist der nach pharmakologischer Aktivierung des Kanals beobachtete transiente Einwärtsstrom mit moderater Auswärtsrektifizierung im positiven Potentialbereich mit den Messungen anderer Arbeitsgruppen identisch (Nilius, 2003). Auch der beobachtete Effekt der extrazellulären Kalziumkonzentration auf die Kanalaktivität deckt sich mit den an TRPV4-überexprimierenden Zellen beschriebenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Unter kalziumfreien Bedingungen sind TRPV4-Einwärtsströme stabil und Auswärtsströme in ihrer Rektifizierung weniger stark ausgeprägt, was auf eine kalziumabhängige Regulation von TRPV4 schließen lässt. Diese Regulation der Kanalaktivität scheint unter physiologischen Gesichtspunkten sinnvoll, da sich der Kalziumeinstrom somit selbst limitiert und ein möglicher Zusammenbruch der

Kalziumhomöostase nach repetitiver TRPV4-Stimulation verhindert wird. Neben den durch den pharmakologischen Aktivator 4αPDD induzierten Strömen konnten charakteristische TRPV4-Ströme nach Stimulation mit Hitze, Reduktion des pH-Werts und der Osmolarität des extrazellulären Mediums beobachtet werden. Diese von ihrer physikalischen Natur her äußerst unterschiedlichen TRPV4-Stimuli sind an verschiedenen Geweben und Zellkultursystemen hinreichend untersucht worden (Liedtke, 2005; Nilius, 2001; Strotmann, 2000). Die TRPV4-Aktivierung durch hypoosmotischen Stress wurde von Fernandez und Nobles (2002) an humanen bronchialen Endothelzellen mit einer nachgeschalteten Aktivierung von Bk-Kanälen in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus der TRPV4-Aktivierung über die PLA₂-katalysierte Umsetzung von Arachidonsäuren (AA) zu Epoxyeicosatriensäuren (EET`s) erfolgt, während die der TRPV4-Aktivierung durch andere Stimuli zugrunde liegenden Mechanismen unklar sind.

4.2 Veränderungen des Zellpotentials

Jeder Austausch von Ladungen über die Grenze der Zellmembran hinaus, wie sie aufgrund der physiologischen Konzentrationsgradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum durch die Öffnung von transmembranären Ionenkanälen initiiert wird, führt zu einer Veränderung des Zellpotentials. Die Größe der Potentialänderung ist u.a. von der Ionenselektivität, der Leitfähigkeit und der Anzahl der aktivierten Kanäle abhängig. Entsprechend kann die Öffnung eines Kationenkanals hyper- oder depolarisierend auf die Zelle wirken. Die Veränderung des Zellpotentials hat in Endothelzellen, wie am Beispiel der Agonisten-induzierten, IP₃-vermittelten Freisetzung aus intrazellulären Speichern gut nachvollzogen werden kann, weitreichende Konsequenzen für die intrazelluläre Signalgebung. Die pharmakologische Aktivierung von TRPV4 führt nicht zu einer drastischen Veränderung des Zellpotentials. Dies war überraschend, da die Aktivierung von Ionenkanälen im Endothel in der Regel einen weitaus größeren Einfluss auf das Zellpotential hat. So führt beispielsweise die Öffnung weniger

kalziumaktivierbarer Kaliumkanäle zu einer starken Hyperpolarisation, wie sie an intakten Endothelzellen der ACC der Ratte nach Stimulation mit ACh beobachtet werden kann. Diese Hyperpolarisation ist notwendig um den nach Speicherentleerung auftretenden Kalziumeinstrom elektrochemisch zu stabilisieren, da sich dieser ansonsten aufgrund seines depolarisierenden Effekts selbst limitieren würde. Applikation von 4aPDD führte am intakten Endothel der Ratte zu einer moderaten biphasischen Änderung des Membranpotentials. Auf eine initiale Depolarisation folgt eine transiente Hyperpolarisation. Diese Hyperpolarisation tritt unter kalziumfreien Bedingungen nicht auf. Da TRPV4 ein nicht-selektiver, für Kalzium- und Natriumionen permeabler Ionenkanal ist, kann die Depolarisation unter kalziumfreien Bedingungen nur auf einen Na^+ -Einstrom zurückzuführen sein. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass ein depolarisierend wirkender Kationeneinwärtsstrom bei einem Haltepotential von -80 mV nach Applikation des impermeablen Kations NMDG⁺ nicht mehr auftritt. Weiterhin legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass TRPV4 nicht als speicherregulierter Kalziumeinstromkanal im Endothel fungieren kann, da eine Kanalaktivierung nach Entleerung intrazellulärer Kalziumpools in der Regel mit drastischen Veränderungen des Zellpotentials einhergeht. Es erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, dass ein PLC-abhängiger Aktivierungsmechanismus existiert, wie er für verschiedene TRP-Kanäle postuliert wurde. Eine G-Protein gekoppelte Rezeptoraktivierung, wie sie beispielsweise nach Stimulation mit ACh auftritt, verursacht über die PLC katalysierte Umsetzung von PIP_2 zu DAG und InsP_3 einen drastischen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Werte von $600 - 1000$ nmol/l. Diese intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zu einer maximalen Aktivierung von kalziumaktivierbarer Kaliumkanäle (IK, SK, BK) und somit zu einer starken Hyperpolarisation des Endothels.

4.3 Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$

In einer Vielzahl von nicht-erregbaren Zellen wird die Agonisten-induzierte Kalziumerhöhung durch die Kalziumfreisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern

eingeleitet und durch einen nachfolgenden Einstrom von extrazellulärem Kalzium aufrechterhalten (Berridge und Galione, 1988; Clapham, 1995). Auch an Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass der rezeptorvermittelte initiale Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Stimulation mit Thrombin (Jaffe, 1987), Histamin (Pollock, 1988) oder Bradykinin (Freay, 1989) und die Agonisten-induzierten Kalziumoszillationen (Jacob, 1991) durch Kalziumfreisetzung aus IP₃-abhängigen Speichern erfolgen.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an isolierten Endothelzellen der thorakalen Aorta der Ratte (RCAEC) zeigten nach pharmakologischer TRPV4-Aktivierung eine Erhöhung der [Ca²⁺]_i um 150 – 200 nmol/l. Vergleichbare Konzentrationsanstiege des intrazellulären Kalziumspiegels wurden nach Stimulation mit Hitze, pH-Wert und hypoosmotischem Stress beobachtet. Es ist denkbar, dass diese im Vergleich zu der Agonisten-induzierten, IP₃-vermittelten Kalziumfreisetzung aus Speicherorganellen relativ geringe Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nicht ausreicht um kalziumaktivierbare Kaliumkanäle (K_{Ca}) wie den iK und/oder sK ausreichend stark zu aktivieren und somit nur eine schwache Zellhyperpolarisation im „*current-clamp*“ Modus beobachtet werden konnte. Diese Hypothese erscheint unter Betrachtung der EC₅₀ für die K_{Ca} von ca. 400 nmol/l Kalzium plausibel. Weiterhin ist unklar, wie der KalziumEinstrom innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Eine genaue Bestimmung des lokalen Konzentrationsverlaufs war im Rahmen dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht möglich.

4.4 Mechanosensitiver KalziumEinstrom

Konkrete Hinweise auf eine Beteiligung des TRPV4-vermittelten KalziumEinstroms an der flussinduzierten Vasodilatation ergaben sich anhand der Vasoreagibilitätsmessungen. Die Erhöhung der Wandschubspannung (WSS) führt in Widerstandsgefäßen verschiedener Spezies zu einer Vasodilatation (Pyke, 2005; Segal, 2005; Watanabe, 2005). Sowohl die über erhöhte Perfusionsraten als auch die über Erhöhung der Viskosität des Perfusionspuffers erreichte Steigerung der WSS führte in den untersuchten Gefäßen der Ratte zu einer starken Vasodilatation. Diese

konnte durch Zugabe des spezifischen TRPV-Blockers Ruthenium-Red (RuR) zum Perfusionspuffer fast vollständig unterdrückt werden. Zusätzlich konnte in *patch-clamp* Experimenten durch vorsichtiges Heranführen einer Glaskapillare an das Endothel ein *shear-stress* induzierter Strom nach Stimulation mittels eines definierten, auf die Zelloberfläche applizierten Flüssigkeitsstroms induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Bislang konnten Kalziumströme wegen der Überlagerung durch den gleichzeitig aktivierten hyperpolarisierenden Kaliumausstrom und wegen der geringen absoluten Stromgröße in Ganzzellstromableitungen nicht registriert werden. Die im Rahmen dieser Studie unter Ausschluss von Kaliumströmen durchgeführten Untersuchungen mit physiologischen Kalziumkonzentrationen führten nach pharmakologischer TRPV4-Aktivierung zu einer biphasischen Änderung des Membranpotentials.

In Experimenten mit sehr niedriger extrazellulärer Kalziumkonzentration konnte ebenfalls eine Depolarisation ausgelöst werden. Dieser Effekt konnte nicht durch eine Entleerung der intrazellulären Speicher hervorgerufen worden sein, da durch Zugabe von ATP, welches zur Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern führt (Carter und Ogden, 1992) und keinen direkten Effekt auf kalziumaktivierte Kaliumkanal hat, nach Stimulation noch TRPV4-Ströme aktiviert werden konnten.

Die Vermutung, dass der Kalziumeinstrom TRPV4 vermittelt ist, wurde durch die Beobachtung gestützt, dass TRPV-Kanäle durch RuR blockiert wurden. Da RuR jedoch eine nicht-spezifische Blockersubstanz ist, welche neben TRPV-Kanälen auch die Kalziumfreisetzung aus Ryanodin-sensitiven Pools inhibiert (Jones, 2005) konnte allein durch den RuR-Block der *shear stress*-induzierten TRPV4-Aktivierung nicht auf einen extrazellulären Kalziumeinstrom geschlossen werden. Inhibition der Ryanodin-sensitiven Speicher durch hohe Konzentrationen von Ryanodin ($\geq 50 \mu\text{mol/l}$) führten jedoch nicht zu einer Verminderung der Zelldepolarisation und in *shear stress* Experimenten an isolierten Gefäßsegmenten nicht zu einer Verminderung der Vasodilatation. Es bedarf jedoch spezifischerer Blockersubstanzen, um sämtliche Kanäle, die den *shear stress*-induzierten Kalziumeinstrom ermöglichen, genau zu identifizieren.

4.4.1 Intrazellulärer Kalziumspeicher

Durch Entleerung der Speicher mit tBHQ konnte an Endothelzellen gezeigt werden, dass die *shear stress*-induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration von einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern abhängig ist (Hoyer, 1997). In der vorliegenden Studie konnte jedoch keine Beteiligung von IP₃-sensitiven Speichern nachgewiesen bzw. durch Blockade des Synthesewegs mit Neomycin und des IP₃-Rezeptors mit Heparin selbst ausgeschlossen werden. Dies war überraschend, da durch *shear stress* an Endothelzellen von menschlichen Nabelschnurvenen nach 30 sec ein Anstieg der intrazellulären IP₃-Konzentration ausgelöst werden konnte (Nollert, 1990). An aortalen Endothelzellen der Ratte ist ein solcher *shear stress*-induzierter IP₃-Anstieg bisher nicht beschrieben worden, so dass hier möglicherweise speziesabhängige und durch die Gefäßart bedingte Unterschiede in der *shear stress*-induzierten IP₃-Erhöhung bestehen.

An Endothelzellen konnten neben IP₃-sensitiven Kalziumspeichern auch Ryanodin-sensitive Kalziumspeicher nachgewiesen werden (Lesh, 1993; Ziegelstein, 1994; Wang, 1995). In der vorliegenden Studie konnte durch Zugabe von Ryanodin, welches in Konzentrationen von mehr als 10 µmol/l den Kalziumkanal am Ryanodinrezeptor der Speicher blockiert (Meissner, 1986; Xu, 1996; Nelson, 1995), gezeigt werden, dass die *shear stress*-induzierte Aktivierung von TRPV4 nicht von der Kalziumfreisetzung aus Ryanodin-sensitiven Speichern abhängig war.

Eine Beteiligung von Ryanodin-sensitiven Speichern an der *shear stress*-Aktivierung von mechanosensitiven Kationenkanälen wird von Laskey (1992) beschrieben. Demnach wird die Freisetzung aus diesen Speichern durch Kalzium selbst ausgelöst und kann bereits durch geringe intrazelluläre Kalziumerhöhungen bzw. durch einen Kalziumeinstrom in die Zelle hervorgerufen werden. Vorstellbar ist, dass ein *shear stress*-induzierter Kalziumeinstrom durch die mechanosensitiven Kationenkanäle eine kalzium-induzierte Kalziumfreisetzung (*calcium-induced calcium release* - CICR) induziert.

Bezogen auf die mechanosensitiven Kationenkanäle könnte eine zeitliche Modulation und Entstehung von intrazellulären

Kalziumkonzentrationsanstiegen durch die transiente Adaptation der Kanäle (Hamill und McBride, 1992) mit nachfolgend wieder restituerter Mechanosensitivität erklärt werden.

Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration stellt einen wichtigen Signaltransduktionsmechanismus dar, mit dem die zelluläre Antwort verschiedenster Gewebe reguliert wird (Berridge, 1993; Thomas, 1995; Clapham, 1995). Insbesondere an Endothelzellen werden durch Agonisten intrazelluläre Kalziumkonzentrationsanstiege ausgelöst, die in Form, Frequenz und Amplitude denen *shear stress*-induzierter Kalziumoszillationen vergleichbar sind (Sage, 1989; Jacob, 1988; Laskey, 1992). An primär kultivierten Endothelzellen der Rinderaorta konnten Helmlinger und Mitarbeiter (1996) *shear stress*-induzierte Kalziumoszillation nachweisen, die in ihrer Kinetik ebenfalls den Messdaten dieser Studie entsprachen. Zusätzlich wurde auch gezeigt, dass *shear stress* einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration auslöst. In der Untersuchung wurde vermutet, dass der Anstieg auf einem Kalziumeinstrom in die Zelle beruht, da die *shear stress*-induzierten Effekte durch Lanthanionen (La^{3+}) blockiert werden konnten. Es wurden jedoch in dieser Studie parallel keine elektrophysiologischen Untersuchungen von Ionenkanälen durchgeführt und die intrazelluläre Signaltransduktion nicht näher untersucht (Helmlinger, 1996).

4.4.2 Mechanosensitiver Kalziumeinstrom an isoliert perfundierten Arterien

Untersuchungen am Endothel von Gefäßstreifen waren bisher nicht durchgeführt worden. Jedoch konnte an isolierten, perfundierten Arterien der Ratte ein Fluss-induzierter Anstieg der endothelialen Kalziumkonzentration auf Werte von bis zu 400 nmol/l nachgewiesen werden (Falcone, 1993). Die Kalziumanstiege bzw. Kalziumoszillationen einzelner Endothelzellen konnten dabei nicht erfasst werden, da aus technischen Gründen eine Abgrenzung einzelner Endothelzellen an Gefäßen mit einer umgebenden muskulären Gefäßwand nicht möglich war.

In einer Studie an venösen Kapillaren von isolierten, mit Blut perfundierten Lungen der Ratte konnten einzelne Endothelzellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration solcher nicht durch Agonisten stimulierten Endothelzellen zeigte, dass an Kapillaren sogenannte Schrittmacherendothelzellen vorhanden sind, die spontane Kalziumoszillationen aufweisen (Ying, 1996). Diese Kalziumoszillationen wurden durch interzelluläre Kalziumwellen auf die benachbarten Endothelzellen übertragen, die durch Entkoppelung der interzellulären Verbindungen (‘gap junctions’) mit Heptanol unterbrochen werden konnten. Dabei beruhten diese Kalziumoszillationen in den Schrittmacherzellen auf einer Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern. Die Mechanosensitivität dieser Kalziumoszillationen wurde nicht genauer untersucht, aber die Oszillationen persistierten, wenn die Perfusion für 10 min gestoppt wurde. Die Untersuchung konnte eine neue Dimension der endothelialen Signaltransduktion aufzeigen und es konnte ein Mechanismus für eine Signalübertragung entlang eines Gefäßes (Ying, 1996; Balke, 1996) postuliert werden. Somit konnten die in der Untersuchung von Helmlinger und Mitarbeitern (1996) und in der vorliegenden Studie beobachteten Kalziumanstiege auch am intakten, perfundierten Gefäßsystem gezeigt werden, ohne dass jedoch eine spezifische Mechanosensitivität nachgewiesen wurde. Die in der vorliegenden Studie gemessenen intrazellulären Kalziumkonzentrationen entsprechen den an Muskelarteriolen (Falcone, 1993) und venösen Kapillaren (Ying, 1996) gemessenen Kalziumkonzentrationen von 35 - 50 nmol/l an unstimulierten und 200 - 400 nmol/l an stimulierten Gefäßendothelzellen. Es bleibt unklar, inwieweit die Ergebnisse von Untersuchungen am venösen Niederdruckkapillarsystem auf die Signaltransduktion arterieller Gefäßendothelzellen übertragbar sind.

4.5 Funktionelle Bedeutung von TRPV4 für die endotheliale Vasoregulation

Die Funktion von endothelialen Ionenkanälen bei der Fluss-induzierten Vasoregulation ist, im Gegensatz zur Bedeutung der Ionenkanäle bei der

Regulation der Endothelfunktion nach Agonistenstimulation, weniger gut aufgeklärt. Es wurde bereits von Lansman und Mitarbeitern (1987) postuliert, dass mechanosensitive Kationenkanäle als endotheliale Mechanosensoren fungieren können. Es wurde aufgrund ihrer Kalziumpermeabilität angenommen, dass sie den Fluss-induzierten Kalziumeinstrom leiten. Zusätzlich können *shear stress*-aktivierte Kaliumkanäle eine Zellhyperpolarisation bewirken (Oleson, 1988). Jedoch konnten diese Untersuchungsergebnisse am nativen Endothel bis vor kurzem nicht festgestellt werden.

In der vorliegenden Studie konnten ein neuartiger mechanosensitiver Kanal am intakten Endothel der Arteria carotis communis der Ratte nachgewiesen und charakterisiert werden. In druckmyographischen Experimenten wurde gezeigt, dass durch den mechanosensitiven Kationenkanal TRPV4 ein signifikanter Kalziumeinstrom erfolgt, welcher eine NO-vermittelte Vasodilatation auslöst. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der verminderten Endothelreaktion auf hämodynamische Stimulierung und einer reduzierten TRPV4-Funktion und Expression bei experimenteller Hypertonie nachgewiesen werden.

Aus den bisher veröffentlichten Untersuchungen und den eigenen Daten lässt sich folgendes Modell zur Regulation der Gefäßendothelfunktion durch TRPV4-Ionenkanäle entwickeln: Der mechanosensitive Ionenkanäle TRPV4 fungiert als endothelialer Mechanosensorer, der einen mechanischen bzw. hämodynamischen Reiz wahrnehmen und mit einer Aktivierung oder Änderung der Kanalaktivität reagiert, wobei die Kanalaktivität graduell der Reizstärke angepasst werden kann. Gleichfalls wird der mechanische Reiz in ein intrazelluläres Signal transformiert, nämlich in einen Kalziumeinstrom mit einer zumindest submembranösen Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dieser Kalziumeinstrom kann über eine Aktivierung der eNOS eine Endothel-vermittelte Vasodilatation auslösen.

Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt unter anderem zu einer Aktivierung von kalziumaktivierten Kaliumkanälen. Der Kaliumausstrom reguliert durch die Hyperpolarisation die Zellfunktion, indem er die Triebkraft bereitstellt und den Ladungsausgleich für den Kalziumeinstrom ermöglicht. Diese Aktivierung von kalziumaktivierten

Kaliumkanälen kann zusätzlich durch vasoaktive Substanzen wie NO oder freie Sauerstoffradikale, die u.a. vom Endothel unter *shear stress* freigesetzt werden, aktiviert oder blockiert werden. So können diese Substanzen die Empfindlichkeit des Endothels für Änderungen der Hämodynamik modulieren.

Die Zellhyperpolarisation könnte zusätzlich durch andere, nicht-kalziumaktivierte Kaliumkanäle hervorgerufen werden. Zum einen können mechanosensitive Kaliumkanäle, wie sie am Rattenendothel nachgewiesen wurden, durch hämodynamische Reize aktiviert werden und durch den Kaliumausstrom die Zelle hyperpolarisieren. Zum anderen können einwärtsrektifizierende Kaliumströme, die möglicherweise durch *shear stress* aktiviert werden (Jacobs, 1995), das Zellpotential zu negativeren Werten verschieben. Dabei kann die *shear stress*-Antwort der Zelle durch vasoaktive Substanzen moduliert werden, indem z. B. Angiotensin II und Vasopressin den einwärtsrektifizierenden Kanal partiell oder vollständig blockieren (Hoyer, 1991) und somit die *shear stress*-induzierte Hyperpolarisation verändern oder inhibieren.

Die Modulation der TRPV4-Funktion kann im Gefäßsystem ein sinnvoller Mechanismus der Endothelzellen zur Aufrechterhaltung ihrer Stimulierbarkeit sein, da die Endothelzellen dauerhaft den, mit dem Blutstrom assoziierten hämodynamischen Kräften wie *shear stress* ausgesetzt sind. Zur Feinregulation der Zellantwort kann die Signalfrequenz über die Regulation der TRPV4-Expression geändert werden, ohne dass eine starke Entleerung der Kalziumspeicher notwendig ist. Eine fehlende Regulation der TRPV4-Expression würde bei stärkeren oder andauernden Stimuli zu einem anhaltenden, starken Kalziumeinstrom führen. Während solcher Stimulationsphasen wäre das Endothel jedoch unempfindlich für andere Agonisten, deren Wirkung ebenfalls an eine kalziumvermittelte Signaltransduktion gekoppelt ist.

4.6 Mechanosensitive Ionenkanäle und arterieller Hypertonie

Untersuchungen zur Veränderung endothelialer Ionenkanäle bei Hypertonie lagen bisher nicht vor. Auch an anderen Zellen des kardiovaskulären

Systems, wie z.B. glatten Gefäßmuskelzellen, wurden Veränderungen von mechanosensitiven Kanälen bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von TRPV4 bei experimenteller Hypertonie stark reduziert ist. Entsprechend ist die pharmakologische Aktivierbarkeit dieses kalziumpermeablen Kationenkanals am Endothel hypertensiver Ratten im Vergleich zu normotensiven Kontrolltieren stark reduziert. Jedoch bedarf es einer differenzierten Betrachtung der Kanalveränderungen bei den verschiedenen Hypertoniemodellen.

Zunächst zeigt die nahezu unveränderte Intensität der ACh-induzierten Vasodilatation bei adulten SHR zwischen der 14. und 18. Lebenswoche, dass die Gefäß- bzw. Endothelfunktion in diesem Stadium der Pathogenese noch erhalten ist. Zusätzlich war nicht nur die NO-vermittelte Vasodilatation, sondern auch die EDHF-medierte Signalgebung bei SHR und WKY annähernd gleich. Dies deutet darauf hin, dass zwischen normotensiven und hypertensiven Tieren zu diesem Zeitpunkt keine grundsätzliche Beeinträchtigung der Gefäßfunktion vorlag, welche auf eine Endotheldysfunktion hinweisen würde.

In Untersuchungen an isolierten Segmenten der ACC der Ratte am Druckmyographen konnte erstmals gezeigt werden, dass TRPV4 an der endothel-vermittelten Vasodilatation beteiligt ist. Die Aktivierung von TRPV4 führt im Endothel der Ratte zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, welche über Aktivierung der NO-Synthase eine NO-vermittelten Vasodilatation auslöst.

4.6.1 Verminderte TRPV4-Funktion und Expression an der Arteria carotis communis von spontan hypertensiven Ratten

Die TRPV4-Funktion bei adulten spontan hypertensiven Ratten ist gegenüber den normotensiven WKY-Kontrolltieren stark reduziert. Demgegenüber wies die Kanalfunktion zwischen jungen prähypertensiven SHR und jungen WKY keinen Unterschied auf. Dies deutet darauf hin, dass die Kanalaktivität nicht vor der Entstehung der Hypertonie, sondern erst bei etablierter Blutdruckerhöhung herunterreguliert ist. Unterstützt wird dies

durch die Beobachtung, dass die Expression von TRPV4 in SHR-Tieren dramatisch reduziert ist. Vergleichende Untersuchungen an normotensiven SD- und WKY-Tieren ergaben keine herunterregulierte TRPV4-Expression. Somit erscheint die Herunterregulation von TRPV4 am aortalen Endothel nicht Ursache, sondern Folge des Bluthochdrucks zu sein. Eine solche Herunterregulation könnte unter Berücksichtigung der postulierten Kanalfunktion mit Kalziumeinstrom und sekundärer Vasodilatation als kompensatorischer oder gegenregulatorischer Mechanismus angesehen werden. Denn eine unveränderte Kanalfunktion würde zu einem gesteigerten mechanosensitiven Kalziumeinstrom führen, der eine Freisetzung von NO hervorruft. Somit könnte die Herunterregulation des Kanals als protektiver Mechanismus interpretiert werden, mit dem das Endothel versucht, die Zellen durch eine Desensitivierung vor einer Schädigung durch erhöhten *shear stress* zu schützen.

Dieses Fehlen der Kanalhochregulation und somit des postulierten kompensatorischen, protektiven Mechanismus könnte zu einer pathologisch veränderten endothelialen Mechanotransduktion bei Hypertonie führen und zu einer endothelialen Dysfunktion beitragen.

Die Funktion von TRPV4 war bei SHR im Vergleich zu WKY dramatisch herunterreguliert, während die Kanalfunktion zwischen den jungen Tieren beider Rattenstämme und den adulten WKY nicht signifikant unterschiedlich war. Wie bereits dargelegt, kann der Verlust der Kanalfunktion, welcher nur bei den adulten SHR auftrat, am ehesten als eine Folge der Blutdruckerhöhung angesehen werden. Molekularbiologische bzw. elektrophysiologische Untersuchungen an Widerstandsgefäßen, wie beispielsweise Mesenterialarterien, konnten nicht durchgeführt werden, da die für die Untersuchung von TRPV4 notwendige Isolierung von Endothelzellen an den Mesenterialarterien wegen der geringen Materialmenge nicht möglich war.

TRPV4 kann einen mechanischen Stimulus in einen Kalziumanstieg und somit in eine Zellhyperpolarisation transformieren. Da die Zellhyperpolarisation die endothelabhängige Vasodilatation fördert, kann die Kanalherunterregulation bei SHR ebenfalls als ein gegenregulatorischer Mechanismus bei Hypertonie angesehen werden.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen gefolgert werden, dass bei Hypertonie eine Herunterregulation des mechanosensitiven TRPV4-Kanals auftritt, die im Sinne eines protektiven Schutzmechanismus des Endothels vor einer permanenten *shear stress*-induziert Kanalaktivierung verhindern könnte. Entsprechend konnte eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation oder endotheliale Freisetzung von NO an einigen SHR beobachtet werden. Zu einer solchen Veränderung bei der Fluß- oder *shear stress*-induzierten Vasodilatation liegen bisher keine Daten vor.

Es ist auch bekannt, dass die Agonisten-induzierte endotheliale Vasodilatation bei experimenteller Hypertonie gestört ist (Konishi und Su, 1983; Dohi, 1990; Dominiczak und Bohr, 1995).

Koller und Mitarbeiter (1994 und 1995) konnten an perfundierten Arteriolen von SHR im Vergleich zu WKY eine verminderte Fluß-induzierte Vasodilatation nachweisen. Diese verminderte Fluß-induzierte Vasodilatation der Arteriolen könnte durch eine reduzierte Kanalexpression und einer damit einhergehenden pathologischen Mechanosensitivität des Endothels hervorgerufen worden sein. An adulten SHR-Tieren ist die TRPV4-Expression vermindert, wodurch die endotheliale Mechanotransduktion und die *shear stress*- oder Fluß-induzierte Vasodilatation gestört sein könnten.

Da jedoch die *shear stress*-vermittelte Vasodilatation nicht ausschließlich auf die Aktivierung von TRPV4-Kanälen zurückzuführen ist bedürfte es, um diese These experimentell zu stützen, bisher nicht verfügbaren spezifischen Blockersubstanzen für sämtliche mechanosensitiven endothelialen Ionenkanäle. Dann könnte bei Ratten mit sekundärer Hypertonie differenziert über die Blockade der einzelnen Kanalsubtypen untersucht werden, inwiefern diese an der Fluß-induzierte Vasodilatation beteiligt sind.

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen bei experimenteller Hypertonie auf eine neuartige Ursache hin: Bei etabliertem Bluthochdruck kommt es zu einer Runterregulation der Kanalexpression und -funktion endothelialer TRPV4-Kanäle, was zu einem reduzierten Kalziumeinstrom und somit zu einer verminderten Freisetzung von vasodilatierenden Substanzen wie NO führt. Eine solche Kanalrunterregulation kann auch als gegenregulatorischer Mechanismus interpretiert werden, mit dem das Endothel vor einer Schädigung durch permanenten Kalziumeinstrom

geschützt wird. Dieser Mechanismus könnte an Gefäßen von Ratten mit genetisch determinierter Hypertonie gestört sein. Durch eine pathologisch veränderte Mechanosensitivität könnte es an diesen Gefäßen zu einer verminderten Fluß-induzierten Vasodilatation kommen, wodurch ein erhöhter peripherer Widerstand hervorgerufen wird. Zusätzlich ist vorstellbar, dass aufgrund einer pathologischen Mechanosensitivität eine anhaltend verminderte, Fluß-induzierte Vasodilatation zu einer Schädigung der Gefäßwand durch zu hohen *shear stress* führt und dadurch strukturelle Veränderungen der Gefäßwand bei arterieller Hypertonie hervorruft.

Zusammenfassung

Das Endothel gilt als hochspezialisiertes Zellsystem, welches über die Ca^{2+} -abhängige Freisetzung vasokonstriktiv bzw. vasodilatatorisch wirksamer Autakoide den Gefäßtonus an die jeweiligen hämodynamischen Gegebenheiten anpasst und eine adäquate Blutversorgung von Organen und Geweben aufrechterhält. Im Endothel erfolgt die Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung u.a. über Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle, die einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum ermöglichen. Eine molekularbiologische Charakterisierung der den Ca^{2+} -Einstrom medierenden Kanäle im Endothel ist bislang nur unzureichend.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, die funktionale Bedeutung des nicht-selektiven, kalziumpermeablen Kationenkanals TRPV4 unter Verwendung vaskulär-biologischer, elektrophysiologischer und molekularbiologischer Untersuchungsmethoden im Endothel der Ratte aufzuklären. Mit der in-situ Patch-Clamp-Methode, multiplex-Einzelzell-RT-PCR und Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzmikroskopie konnten endotheliale TRPV4 im nativen Endothel der Ratte identifiziert und charakterisiert werden. Pharmakologische Stimulation von TRPV4 mittels des selektiven Agonisten 4aPDD führte an nativen Endothelzellen der Ratte zu einem signifikanten Kalziumeinstrom und in Experimente an isoliert perfundierten Arterien zu einer Endothel-abhängigen Vasodilatation, welche durch den selektiven TRPV-Blocker Ruthenium Red (RuR) inhibiert werden konnte. Weiterhin konnte eine Aktivierung von TRPV4 durch verschiedene chemische und physikalische Stimuli, wie niedrigen pH-Wert, moderate Hitze und hypoosmotische Zellschwellung, ausgelöst werden. Erhöhung der Wandschubspannung führte in den untersuchten Gefäßen ebenfalls zu einer TRPV4-vermittelten Vasodilatation, was auf eine mechanosensitive Funktion des Kanals im vaskulären System hinweist. Weiterführenden Untersuchungen am Hypertoniemodell zeigten eine verminderte TRPV4-Funktion und Expression unter pathophysiologischen Bedingungen. Insgesamt konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass der Ionenkanal TRPV4 den bei der endothelialen

Mechanotransduktion wichtigen intrazellulären Kalziueinstrom ermöglicht und somit die Vasoreaktion auf hämodynamische Veränderungen regulieren kann. Anhand der Untersuchungen am Hypertoniemodell kann davon ausgegangen werden, dass TRPV4 eine Bedeutung in der mit dem Krankheitsbild der Hypertonie einhergehenden endothelialen Dysfunktion zukommt.

Summary

Ca²⁺-influx in response to mechanical or humoral stimulation plays a significant role in a variety of endothelial functions and especially in the Ca²⁺-dependent synthesis of endothelial vasodilators such as nitric oxide or the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). Several members of the “transient receptor potential” (TRP)-superfamily of cation channels have been identified in endothelium of humans and other species and may provide Ca²⁺-influx pathways.

However the functional role of TRPV4 in the endothelium is not clear. In this study, function and expression of TRPV4 channels in rat carotid artery (CA) were characterized by employing *in-situ* patch-clamp techniques and single-cell-RT-PCR analysis, measurements of Ca²⁺-influx through TRPV4, and conducted pressure-myograph experiments in CA and small-sized A. gracilis to test vasodilatory responses after pharmacological activation of the channel by 4αPDD and after increasing wall shear stress (WSS). In pressure-myograph experiments, it was investigated how TRPV4 contributes to endothelium-dependent vasodilatation. Endothelial TRPV4 was activated by the selective TRPV4-opener 4α-phorbol-12,13-didecanoate (4αPDD), low pH, moderate warmth, and mechanically by hypotonic cell swelling. Activation of TRPV4 by 4αPDD increased intracellular [Ca²⁺]_i significantly above basal levels. In pressure-myograph experiments intraluminal application of 4αPDD caused a robust vasodilatation which was strictly endothelium-dependent and was suppressed by the TRPV4-inhibitor ruthenium red. Regarding the physiological stimulus for endothelial TRPV4 activation, it was found that wall shear stress (WSS)-induced vasodilatation was similarly blocked by RuR and that TRPV4 expression and function is absent in experimental hypertension. In conclusion, Ca²⁺-entry through endothelial TRPV4 channels triggers NO-dependent vasodilatation in rat endothelium. TRPV4 channel may thus play a pivotal role in endothelial mechanosensing of hemodynamic forces and in arterial hypertension.

Lebenslauf

Persönliches

Philipp Heinau
geboren am 23.12.1975 in Hannover
ledig

Schulbildung

1982 - 1986 Grundschule in Gehrden/Hannover
1986 – 1988 Orientierungsstufe in Gehrden/Hannover
1988 – 1995 Gymnasium mit Abitur in Gehrden/Hannover

Hochschulbildung

1996 – 2003 an der Technischen Universität Berlin
Studium der Biotechnologie
Studienschwerpunkt: Medizinische Biotechnologie

Promotion

2003 - 2006 an der Technischen Universität Berlin
Thema: Die Rolle von TRPV4-Kationenkanälen bei der
Vasoregulation und der arteriellen Hypertonie

Berufstätigkeit

1999 – 2001 Praktikum, Werksstudent und Diplomarbeit bei der
Schering AG Berlin, Abteilung Experimentelle
Toxikologie (Paracetamol induzierte Änderungen der
CYP450-Expression in Rattenhepatozyten)

2001 – 2003 studentische Hilfskraft am Institut für Biotechnologie der
TU-Berlin (Planung, Betreuung und Durchführung der
studienbegleitenden Praktika in Biochemie)

Vorträge

November 2005 Symposium der Forschergruppe 341, Virchow-
Klinikum der Charite, Berlin

März 2006 Jahrestreffen der Deutschen Physiologischen
Gesellschaft, München

April 2006 FASEB-conference on Experimental Biology, San
Francisco

Publikationen

**Köhler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H,
Kacik M, Busch C, Grgic I, Meyer T, Hoyer J.**
Evidence for a functional role of endothelial transient
receptor potential V4 in shear stress-induced
vasodilatation.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Jul; 26(7):1495-
502. Epub 2006 May 4.

Köhler R, Eichler I, Schönfelder H, Grgic I, Heinau P, Si H, Hoyer J. Impaired EDHF-mediated vasodilation and function of endothelial Ca²⁺-activated K⁺-channels in uremic rats. *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2280-7.

Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J, Köhler R. Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 704-709, 2005.

Literaturverzeichnis

1. **Andrade FH, McMullen CA and Rumbaut RE.** Mitochondria are fast Ca²⁺ sinks in rat extraocular muscles: a novel regulatory influence on contractile function and metabolism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 4541-4547, 2005.
2. **Andrade YN, Fernandes J, Vazquez E, Fernandez-Fernandez JM, Arniges M, Sanchez TM, Villalon M and Valverde MA.** TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J Cell Biol* 168: 869-874, 2005.
3. **Angus JA and Lew MJ.** Interpretation of the acetylcholine test of endothelial cell dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl* 10: S179-S186, 1992.
4. **Angus JA, Jennings GL and Sudhir K .** Enhanced contraction to noradrenaline, serotonin and nerve stimulation but normal endothelium-derived relaxing factor response in skin small arteries in human primary hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 19: 39-47, 1992.
5. **Antony I, Lerebours G and Nitenberg A.** Loss of flow-dependent coronary artery dilatation in patients with hypertension. *Circulation* 91: 1624-1628, 1995.
6. **Antony I, Lerebours G and Nitenberg A.** Angiotensin-converting enzyme inhibition restores flow-dependent and cold pressor test-induced dilations in coronary arteries of hypertensive patients. *Circulation* 94: 3115-3122, 1996.
7. **Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I and Busse R.** Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res* 78: 750-758, 1996.
8. **Baccaglini PI and Hogan PG.** Some rat sensory neurons in culture express characteristics of differentiated pain sensory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 594-598, 1983.
9. **Baron A, Rakotoarisoa L, Lepretre N and Mironneau J.** Inhibition of L-type Ca²⁺ channels in portal vein myocytes by the enantiomers of oxodipine. *Eur J Pharmacol* 269: 105-113, 1994.
10. **Beny JL.** Information Networks in the Arterial Wall. *News Physiol Sci* 14: 68-73, 1999.

11. **Berridge MJ.** Capacitative calcium entry. *Biochem J* 312 (Pt 1): 1-11, 1995.
Ref ID: 245
12. **Berridge MJ.** Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Ann N Y Acad Sci* 766: 31-43, 1995.
13. **Berridge MJ.** Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* 17: 491-500, 1995.
14. **Birnbaumer L, Zhu X, Jiang M, Boulay G, Peyton M, Vannier B, Brown D, Platano D, Sadeghi H, Stefani E and Birnbaumer M.** On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 15195-15202, 1996.
15. **Bleakman D, Brorson JR and Miller RJ.** The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br J Pharmacol* 101: 423-431, 1990.
16. **Brakemeier S, Kersten A, Eichler I, Grgic I, Zakrzewicz A, Hopp H, Kohler R and Hoyer J.** Shear stress-induced up-regulation of the intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channel in human endothelium. *Cardiovasc Res* 60: 488-496, 2003.
17. **Buckley BJ, Barchowsky A, Dolor RJ and Whorton AR.** Regulation of arachidonic acid release in vascular endothelium. Ca(2+)-dependent and -independent pathways. *Biochem J* 280 (Pt 2): 281-287, 1991.
18. **Busse R, Trogisch G and Bassenge E.** The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res Cardiol* 80: 475-490, 1985.
19. **Busse R, Fichtner H, Luckhoff A and Kohlhardt M.** Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol* 255: H965-H969, 1988.
20. **Busse R, Fleming I and Hecker M.** Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J* 14 Suppl I: 2-9, 1993.
21. **Cai S, Garneau L and Sauve R.** Single-channel characterization of the pharmacological properties of the K(Ca²⁺) channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol* 163: 147-158, 1998.

22. **Casteels R, Raeymaekers L, Suzuki H and Van EJ.** Tension response and ^{45}Ca release in vascular smooth muscle incubated in Ca-free solution. *Pflugers Arch* 392: 139-145, 1981.
23. **Casteels R and Droogmans G.** Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J Physiol* 317: 263-279, 1981.
24. **Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D.** The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824, 1997.
25. **Chakrabarti R and Kumar S.** Diacylglycerol mediates the T-cell receptor-driven Ca^{2+} influx in T cells by a novel mechanism independent of protein kinase C activation. *J Cell Biochem* 78: 222-230, 2000.
26. **Chen GF and Suzuki H.** Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol* 421: 521-534, 1990.
27. **Chyb S, Raghu P and Hardie RC.** Polyunsaturated fatty acids activate the Drosophila light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397: 255-259, 1999.
28. **Clapham DE.** Calcium signaling. *Cell* 80: 259-268, 1995.
29. **Clapham DE.** TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-524, 2003.
30. **Cockcroft KM, Meistrell M, III, Zimmerman GA, Risucci D, Bloom O, Cerami A and Tracey KJ.** Cerebroprotective effects of aminoguanidine in a rodent model of stroke. *Stroke* 27: 1393-1398, 1996.
31. **Colden-Stanfield M, Schilling WP, Ritchie AK, Eskin SG, Navarro LT and Kunze DL.** Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 61: 632-640, 1987.
32. **Colden-Stanfield M, Schilling WP, Possani LD and Kunze DL.** Bradykinin-induced potassium current in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Membr Biol* 116: 227-238, 1990.

33. **Cooke JP, Rossitch E Jr, Andon NA, Loscalzo J and Dzau VJ.** Flow activates an endothelial potassium channel to release an endogenous nitrovasodilator. *J Clin Invest* 88: 1663-1671, 1991.
34. **Cosens DJ and Manning A.** Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224: 285-287, 1969.
35. **Davies PF, Mundel T and Barbee KA .** A mechanism for heterogeneous endothelial responses to flow in vivo and in vitro. *J Biomech* 28: 1553-1560, 1995.
36. **Davies PF.** Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75: 519-560, 1995.
37. **Davies PF, Barbee KA, Lal R, Robotewskyj A and Griem ML.** Hemodynamics and atherogenesis. Endothelial surface dynamics in flow signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 748: 86-102, 1995.
38. **Delaney K, Davison I and Denk W.** Odour-evoked $[Ca^{2+}]$ transients in mitral cell dendrites of frog olfactory glomeruli. *Eur J Neurosci* 13: 1658-1672, 2001.
39. **DeLisle S, Blondel O, Longo FJ, Schnabel WE, Bell GI and Welsh MJ.** Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors changes the Ca^{2+} signal of *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol* 270: C1255-C1261, 1996.
40. **Denis V and Cyert MS.** Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol* 156: 29-34, 2002.
41. **Diamond DA and Ford C.** Neonatal bladder rupture: a complication of umbilical artery catheterization. *J Urol* 142: 1543-1544, 1989.
42. **Dolor RJ, Strauss HC and Whorton AR.** Mechanism of calcium influx in endothelial cells: role of intracellular calcium. *Trans Assoc Am Physicians* 103: 38-47, 1990.
43. **Dolor RJ, Hurwitz LM, Mirza Z, Strauss HC and Whorton AR.** Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool. *Am J Physiol* 262: C171-C181, 1992.
44. **Dominiczak AF and Bohr DF.** Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* 25: 1202-1211, 1995.

45. **Dzau VJ**. The role of mechanical and humoral factors in growth regulation of vascular smooth muscle and cardiac myocytes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2: 27-32, 1993.
46. **Egashira K, Suzuki S, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Imaizumi T and Takeshita A**. Impaired endothelium-dependent vasodilation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension. Different responses to acetylcholine and substance P. *Hypertension* 25: 201-206, 1995.
47. **Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL and Machado RA**. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 5: 4, 2006.
48. **Falcone JC, Granger HJ and Meininger GA**. Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arterioles from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 265: H1847-H1855, 1993.
49. **Fasolato C, Innocenti B and Pozzan T**. Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? *Trends Pharmacol Sci* 15: 77-83, 1994.
50. **Feletou M and Vanhoutte PM**. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. *J Physiol Pharmacol* 50: 525-534, 1999.
51. **Fichtner H, Frobe U, Busse R and Kohlhardt M**. Single nonselective cation channels and Ca²⁺-activated K⁺ channels in aortic endothelial cells. *J Membr Biol* 98: 125-133, 1987.
52. **Fitscha P, Keiler A, Rauscha F, O'Grady J and Sinzinger H**. The diminished extracellular matrix production induced by isradipine, a calcium channel blocker, is completely abolished by cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 45: 289-291, 1992.
53. **Fonfria E, Murdock PR, Cusdin FS, Benham CD, Kelsell RE and McNulty S**. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. *J Recept Signal Transduct Res* 26: 159-178, 2006.
54. **Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J and Benjamin N**. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 349: 837-842, 1997.
55. **Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV and Ives CL**. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227: 1477-1479, 1985.

56. **Freay A, Johns A, Adams DJ, Ryan US and Van BC.** Bradykinin and inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated calcium release from intracellular stores in cultured bovine endothelial cells. *Pflugers Arch* 414: 377-384, 1989.

57. **Freichel M, Suh SH, Pfeifer A, Schweig U, Trost C, Weissgerber P, Biel M, Philipp S, Freise D, Droogmans G, Hofmann F, Flockerzi V and Nilius B.** Lack of an endothelial store-operated Ca²⁺ current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRP4^{-/-} mice. *Nat Cell Biol* 3: 121-127, 2001.

58. **Friel DD.** TRP: its role in phototransduction and store-operated Ca²⁺ entry. *Cell* 85: 617-619, 1996.

59. **Furchgott RF.** Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* 19: 235-251, 1999.

60. **Geiger RV, Berk BC, Alexander RW and Nerem RM.** Flow-induced calcium transients in single endothelial cells: spatial and temporal analysis. *Am J Physiol* 262: C1411-C1417, 1992.

61. **Grgic I, Eichler I, Heinau P, Si H, Brakemeier S, Hoyer J and Kohler R.** Selective blockade of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel suppresses proliferation of microvascular and macrovascular endothelial cells and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 704-709, 2005.

62. **Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985.

63. **Halaszovich CR, Zitt C, Jungling E and Luckhoff A.** Inhibition of TRP3 channels by lanthanides. Block from the cytosolic side of the plasma membrane. *J Biol Chem* 275: 37423-37428, 2000.

64. **Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ.** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100, 1981.

65. **Hardie RC and Minke B.** The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* 8: 643-651, 1992.

66. **Harteneck C, Obukhov AG, Zobel A, Kalkbrenner F and Schultz G.** The Drosophila cation channel trpl expressed in insect Sf9 cells is stimulated by agonists of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett* 358: 297-300, 1995.

67. **Helmlinger G, Berk BC and Nerem RM.** Pulsatile and steady flow-induced calcium oscillations in single cultured endothelial cells. *J Vasc Res* 33: 360-369, 1996.
68. **Himmel HM, Whorton AR and Strauss HC.** Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 21: 112-127, 1993.
69. **Himmel HM, Rasmusson RL and Strauss HC.** Agonist-induced changes of $[Ca^{2+}]_i$ and membrane currents in single bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 267: C1338-C1350, 1994.
70. **Hofmann F, Lacinova L and Klugbauer N.** Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139: 33-87, 1999.
71. **Holland MJ, Holland JP, Thill GP and Jackson KA.** The primary structures of two yeast enolase genes. Homology between the 5' noncoding flanking regions of yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *J Biol Chem* 256: 1385-1395, 1981.
72. **Hoth M and Penner R.** Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355: 353-356, 1992.
73. **Hoyer J, Distler A, Haase W and Gogelein H.** Ca^{2+} influx through stretch-activated cation channels activates maxi K^+ channels in porcine endocardial endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2367-2371, 1994.
74. **Hoyer J, Kohler R, Haase W and Distler A.** Up-regulation of pressure-activated Ca^{2+} -permeable cation channel in intact vascular endothelium of hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11253-11258, 1996.
75. **Hoyer J, Kohler R and Distler A.** Mechanosensitive cation channels in aortic endothelium of normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 30: 112-119, 1997.
76. **Hoyer J.** Endothelial vasoregulation and mechanosensitive ion channels in hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 12: 6-8, 1997.
77. **Hoyer J, Kohler R and Distler A.** Mechanosensitive Ca^{2+} oscillations and STOC activation in endothelial cells. *FASEB J* 12: 359-366, 1998.

78. **Hsieh WL, Pierce WS and Sze H.** Calcium-Pumping ATPases in Vesicles from Carrot Cells : Stimulation by Calmodulin or Phosphatidylserine, and Formation of a 120 Kilodalton Phosphoenzyme. *Plant Physiol* 97: 1535-1544, 1991.
79. **Hu Y, Vaca L, Zhu X, Birnbaumer L, Kunze DL and Schilling WP.** Appearance of a novel Ca²⁺ influx pathway in Sf9 insect cells following expression of the transient receptor potential-like (trpl) protein of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 1050-1056, 1994.
80. **Hu Y and Schilling WP.** Receptor-mediated activation of recombinant Trpl expressed in Sf9 insect cells. *Biochem J* 305 (Pt 2): 605-611, 1995.
81. **Hutcheson IR and Griffith TM.** Heterogeneous populations of K⁺ channels mediate EDRF release to flow but not agonists in rabbit aorta. *Am J Physiol* 266: H590-H596, 1994.
82. **Iiyama K, Nagano M, Yo Y, Nagano N, Kamide K, Higaki J, Mikami H and Ogihara T.** Impaired endothelial function with essential hypertension assessed by ultrasonography. *Am Heart J* 132: 779-782, 1996.
83. **Ikeuchi Y and Nishizaki T.** Dual effects of ATP on the potassium channel and intracellular Ca²⁺ release in smooth muscle cells of the bovine brain arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 1071-1077, 1995.
84. **Jacob R.** Calcium oscillations in electrically non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta* 1052: 427-438, 1990.
85. **Jacob R.** Agonist-stimulated divalent cation entry into single cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Physiol* 421: 55-77, 1990.
86. **Jacob TJ.** Two outward K⁺ currents in bovine pigmented ciliary epithelial cells: IK(Ca) and IK(V). *Am J Physiol* 261: C1055-C1062, 1991.
87. **Jiang L, Jha V, Dhanabal M, Sukhatme VP and Alper SL.** Intracellular Ca(2+) signaling in endothelial cells by the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1140-C1150, 2001.
88. **Johns A, Leijten P, Yamamoto H, Hwang K and Van BC.** Calcium regulation in vascular smooth muscle contractility. *Am J Cardiol* 59: 18A-23A, 1987.
89. **Johns A, Lategan TW, Lodge NJ, Ryan US, Van BC and Adams DJ.** Calcium entry through receptor-operated channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Tissue Cell* 19: 733-745, 1987.

90. **Jones JL, Reynolds DF, Lai FA and Blayney LM.** Ryanodine receptor binding to FKBP12 is modulated by channel activation state. *J Cell Sci* 118: 4613-4619, 2005.
91. **Kamouchi M, Trouet D, De GC, Droogmans G, Eggermont J and Nilius B.** Functional effects of expression of hsl α Ca²⁺ activated K⁺ channels in cultured macrovascular endothelial cells. *Cell Calcium* 22: 497-506, 1997.
92. **Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H and Kojima I.** Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* 1: 165-170, 1999.
93. **Kelm M, Schafer S, Preik M, Schoebel FC, Preik-Steinhoff H and Strauer BE.** [Coronary vasomotion in coronary heart disease--significance of epicardial and microcirculatory vessels for myocardial perfusion]. *Z Kardiol* 86 Suppl 1: 33-41, 1997.
94. **Kerschbaum HH and Cahalan MD.** Single-channel recording of a store-operated Ca²⁺ channel in Jurkat T lymphocytes. *Science* 283: 836-839, 1999.
95. **Kim KY, Shin YW, Kim SO, Lim H, Yoo SE and Hong KW.** Antiangiogenic effect of KR-31372 by apoptosis via mediation of mitochondrial KATP channel opening and the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 1142-1149, 2003.
96. **Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, Kuo T, Pessah I, Mignery G, Zhu X, Birnbaumer L and Muallem S.** Functional interaction between InsP₃ receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396: 478-482, 1998.
97. **Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX and Muallem S.** The N-terminal domain of the IP₃ receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 4: 423-429, 1999.
98. **Kiselyov K and Muallem S.** Fatty acids, diacylglycerol, Ins(1,4,5)P₃ receptors and Ca²⁺ influx. *Trends Neurosci* 22: 334-337, 1999.
99. **Kitamura K, Teramoto N, Oike M, Xiong ZL, Kajioka S, Inoue Y, Nilius B and Kuriyama H.** Characteristics of the voltage-dependent calcium channel in smooth muscle: patch-clamp studies. *Adv Exp Med Biol* 304: 209-227, 1991.
100. **Kohler R, Degenhardt C, Kuhn M, Runkel N, Paul M and Hoyer J.** Expression and function of endothelial Ca(2+)-activated K(+) channels in human mesenteric artery: A single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study in situ. *Circ Res* 87: 496-503, 2000.

101. **Kohler R, Grundig A, Brakemeier S, Rothermund L, Distler A, Kreutz R and Hoyer J.** Regulation of pressure-activated channel in intact vascular endothelium of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 14: 716-721, 2001.

102. **Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, Degenhardt C, Buhr H, Pries A and Hoyer J.** Expression of ryanodine receptor type 3 and TRP channels in endothelial cells: comparison of in situ and cultured human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 51: 160-168, 2001.

103. **Kohler R, Wulff H, Eichler I, Kneifel M, Neumann D, Knorr A, Grgic I, Kampfe D, Si H, Wibawa J, Real R, Borner K, Brakemeier S, Orzechowski HD, Reusch HP, Paul M, Chandy KG and Hoyer J.** Blockade of the intermediate-conductance calcium-activated potassium channel as a new therapeutic strategy for restenosis. *Circulation* 108: 1119-1125, 2003.

104. **Koller A, Sun D, Huang A and Kaley G.** Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol* 267: H326-H332, 1994.

105. **Koller A and Huang A.** Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 74: 416-421, 1994.

106. **Kuhlmann CR, Wu Y, Li F, Munz BM, Tillmanns H, Waldecker B and Wiecha J.** bFGF activates endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels involving G-proteins and tyrosine kinases. *Vascul Pharmacol* 41: 181-186, 2004.

107. **Kung CF, Moreau P, Takase H and Luscher TF.** L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension* 26: 744-751, 1995.

108. **Kuo L, Davis MJ and Chilian WM.** Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol* 259: H1063-H1070, 1990.

109. **Kuo L, Chilian WM and Davis MJ.** Coronary arteriolar myogenic response is independent of endothelium. *Circ Res* 66: 860-866, 1990.

110. **Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F and Rossier J.** AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9: 247-258, 1992.

111. **Lansman JB, Hallam TJ and Rink TJ.** Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* 325: 811-813, 1987.

112. **Lehoux S, Castier Y and Tedgui A** . Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med* 259: 381-392, 2006.
113. **Lepple-Wienhues A and Cahalan MD** . Conductance and permeation of monovalent cations through depletion-activated Ca²⁺ channels (ICRAC) in Jurkat T cells. *Biophys J* 71: 787-794, 1996.
114. **Lepple-Wienhues A, Berweck S, Bohmig M, Leo CP, Meyling B, Garbe C and Wiederholt M**. K⁺ channels and the intracellular calcium signal in human melanoma cell proliferation. *J Membr Biol* 151: 149-157, 1996.
115. **Levesque MJ and Nerem RM**. The study of rheological effects on vascular endothelial cells in culture. *Biorheology* 26: 345-357, 1989.
116. **Lewis RS and Cahalan MD**. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul* 1: 99-112, 1989.
117. **Li J and Bukoski RD**. Endothelium-dependent relaxation of hypertensive resistance arteries is not impaired under all conditions. *Circ Res* 72: 290-296, 1993.
118. **Li Y, Wright JM, Qian F, Germino GG and Guggino WB**. Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling. *J Biol Chem* 280: 41298-41306, 2005.
119. **Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM and Heller S**. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525-535, 2000.
120. **Liedtke W**. TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflugers Arch* 451: 176-180, 2005.
121. **Linder C and Heusch G**. ACE inhibitors for the treatment of myocardial ischemia? *Cardiovasc Drugs Ther* 4: 1375-1384, 1990.
122. **Luckhoff A and Busse R**. Refilling of endothelial calcium stores without bypassing the cytosol. *FEBS Lett* 276: 108-110, 1990.
123. **Luckhoff A and Clapham DE**. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca⁽²⁺⁾-permeable channel. *Nature* 355: 356-358, 1992.

124. **Luscher TF.** The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 15: 482-485, 1990.
125. **Luscher TF.** Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur Heart J* 13 Suppl D: 50-55, 1992.
126. **Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K and Gill DL.** Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* 287: 1647-1651, 2000.
127. **Malek AM and Izumo S.** Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* 109 (Pt 4): 713-726, 1996.
128. **McKay RR, Szymeczek-Seay CL, Lievremont JP, Bird GS, Zitt C, Jungling E, Luckhoff A and Putney JW, Jr.** Cloning and expression of the human transient receptor potential 4 (TRP4) gene: localization and functional expression of human TRP4 and TRP3. *Biochem J* 351 Pt 3: 735-746, 2000.
129. **Melkumyants AM, Balashov SA, Veselova ES and Khayutin VM.** Continuous control of the lumen of feline conduit arteries by blood flow rate. *Cardiovasc Res* 21: 863-870, 1987.
130. **Melkumyants AM, Balashov SA and Khayutin VM.** Endothelium dependent control of arterial diameter by blood viscosity. *Cardiovasc Res* 23: 741-747, 1989.
131. **Melkumyants AM, Balashov SA and Kartamyshev SP.** Anticonstrictor effect of endothelium sensitivity to shear stress. *Pflugers Arch* 427: 264-269, 1994.
132. **Mo M, Eskin SG and Schilling WP.** Flow-induced changes in Ca²⁺ signaling of vascular endothelial cells: effect of shear stress and ATP. *Am J Physiol* 260: H1698-H1707, 1991.
133. **Mombouli JV and Vanhoutte PM.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor(s): updating the unknown. *Trends Pharmacol Sci* 18: 252-256, 1997.
134. **Montell C, Jones K, Hafen E and Rubin G.** Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230: 1040-1043, 1985.

135. **Montell C and Rubin GM.** Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 2: 1313-1323, 1989.
136. **Morris JJ, Jr.** Mechanisms of ischemia in coronary artery disease: spontaneous decrease in coronary blood supply. *Am Heart J* 120: 746-756, 1990.
137. **Nabel EG, Selwyn AP and Ganz P.** Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 16: 349-356, 1990.
138. **Nadler MJ, Hermosura MC, Inabe K, Perraud AL, Zhu Q, Stokes AJ, Kurosaki T, Kinet JP, Penner R, Scharenberg AM and Fleig A.** LTRPC7 is a Mg.ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* 411: 590-595, 2001.
139. **Nagamine K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F and Shimizu N.** Molecular cloning of a novel putative Ca²⁺ channel protein (TRPC7) highly expressed in brain. *Genomics* 54: 124-131, 1998.
140. **Nagao T and Vanhoutte PM.** Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol* 445: 355-367, 1992.
141. **Nakache M and Gaub HE.** Hydrodynamic hyperpolarization of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 1841-1843, 1988.
142. **Naruse K and Sokabe M.** Involvement of stretch-activated ion channels in Ca²⁺ mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol* 264: C1037-C1044, 1993.
143. **Naruse K and Sokabe M.** Involvement of stretch-activated ion channels in Ca²⁺ mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol* 264: C1037-C1044, 1993.
144. **Neher E and Sakmann B.** Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802, 1976.
145. **Neher E, Marty A and Fenwick E.** Ionic channels for signal transmission and propagation. *Prog Brain Res* 58: 39-48, 1983.
146. **Neher E.** Ion channels for communication between and within cells. *Science* 256: 498-502, 1992.

147. **Nilius B.** Permeation properties of a non-selective cation channel in human vascular endothelial cells. *Pflugers Arch* 416: 609-611, 1990.
148. **Nilius B, Schwarz G and Droogmans G.** Control of intracellular calcium by membrane potential in human melanoma cells. *Am J Physiol* 265: C1501-C1510, 1993.
149. **Nilius B, Viana F and Droogmans G.** Ion channels in vascular endothelium. *Annu Rev Physiol* 59: 145-170, 1997.
150. **Nilius B, Eggermont J and Droogmans G.** The endothelial volume-regulated anion channel, VRAC. *Cell Physiol Biochem* 10: 313-320, 2000.
151. **Nilius B and Droogmans G.** Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81: 1415-1459, 2001.
152. **Nilius B, Watanabe H and Vriens J.** The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour. *Pflugers Arch* 446: 298-303, 2003.
153. **Oechslin E, Kiowski W, Schindler R, Bernheim A, Julius B and Brunner-La Rocca HP.** Systemic endothelial dysfunction in adults with cyanotic congenital heart disease. *Circulation* 112: 1106-1112, 2005.
154. **Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K and Mori Y.** Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274: 27359-27370, 1999.
155. **Olesen SP, Davies PF and Clapham DE.** Muscarinic-activated K⁺ current in bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 62: 1059-1064, 1988.
156. **Pak WL, Grossfield J and Arnold KS.** Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 227: 518-520, 1970.
157. **Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr. and Epstein SE.** Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27, 1990.
158. **Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM and Quyyumi AA.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular

- relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87: 1468-1474, 1993.
159. **Parekh AB and Penner R.** Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-930, 1997.
160. **Parekh AB, Fleig A and Penner R.** The store-operated calcium current I(CRAC): nonlinear activation by InsP3 and dissociation from calcium release. *Cell* 89: 973-980, 1997.
161. **Parekh AB and Penner R.** Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77: 901-930, 1997.
162. **Petersen CC and Berridge MJ.** The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269: 32246-32253, 1994.
163. **Peterson BZ and Catterall WA.** Calcium binding in the pore of L-type calcium channels modulates high affinity dihydropyridine binding. *J Biol Chem* 270: 18201-18204, 1995.
164. **Phillips AM, Bull A and Kelly LE .** Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. *Neuron* 8: 631-642, 1992.
165. **Poenie M, Alderton J, Tsien RY and Steinhardt RA.** Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle. *Nature* 315: 147-149, 1985.
166. **Pohl U, Holtz J, Busse R and Bassenge E.** Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* 8: 37-44, 1986.
167. **Popp R, Hoyer J, Meyer J, Galla HJ and Gogelein H.** Stretch-activated non-selective cation channels in the antiluminal membrane of porcine cerebral capillaries. *J Physiol* 454: 435-449, 1992.
168. **Pusch M and Neher E.** Rates of diffusional exchange between small cells and a measuring patch pipette. *Pflugers Arch* 411: 204-211, 1988.
169. **Putney JW, Jr., Aub DL, Taylor CW and Merritt JE.** Formation and biological action of inositol 1,4,5-trisphosphate. *Fed Proc* 45: 2634-2638, 1986.

170. **Putney JW, Jr.** A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12, 1986.
171. **Putney JW, Jr. and Bird GS.** The signal for capacitative calcium entry. *Cell* 75: 199-201, 1993.
172. **Putney JW, Jr.** Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. *Cell Calcium* 21: 257-261, 1997.
173. **Putney JW, Jr., Trebak M, Vazquez G, Wedel B and Bird GS.** Signalling mechanisms for TRPC3 channels. *Novartis Found Symp* 258: 123-133, 2004.
174. **Pyke KE and Tschakovsky ME.** The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol* 568: 357-369, 2005.
175. **Qian F and Noben-Trauth K.** Cellular and molecular function of mucolipins (TRPML) and polycystin 2 (TRPP2). *Pflugers Arch* 451: 277-285, 2005.
176. **Resnik KS, Kantor GR, Spielvogel RL and Ryan E.** Cutaneous epithelioid hemangioendothelioma without systemic involvement. *Am J Dermatopathol* 15: 272-276, 1993.
177. **Romano SM, Scolletta S, Olivotto I, Biagioli B, Gensini GF, Chiostri M and Giomarelli P.** Systemic arterial waveform analysis and assessment of blood flow during extracorporeal circulation. *Perfusion* 21: 109-116, 2006.
178. **Runnels LW, Yue L and Clapham DE .** The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. *Nat Cell Biol* 4: 329-336, 2002.
179. **Sackin H.** Stretch-activated ion channels. *Kidney Int* 48: 1134-1147, 1995.
180. **Sackin H.** Mechanosensitive channels. *Annu Rev Physiol* 57: 333-353, 1995.
181. **Schilling WP.** Effect of membrane potential on cytosolic calcium of bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 257: H778-H784, 1989.
182. **Segal SS.** Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation* 12: 33-45, 2005.

183. **Semenova SB, Kiselev KI and Mozhaeva GN.** Low-conductivity calcium channels in the macrophage plasma membrane: activation by inositol-1,4,5-triphosphate. *Neurosci Behav Physiol* 29: 339-345, 1999.
184. **Shen J, Luscinikas FW, Connolly A, Dewey CF, Jr. and Gimbrone MA, Jr.** Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 262: C384-C390, 1992.
185. **Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M and Takeshita A.** The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 703-711, 1996.
186. **Sigurdson WJ, Sachs F and Diamond SL.** Mechanical perturbation of cultured human endothelial cells causes rapid increases of intracellular calcium. *Am J Physiol* 264: H1745-H1752, 1993.
187. **Sokabe M, Nunogaki K, Naruse K and Soga H.** Mechanics of patch clamped and intact cell-membranes in relation to SA channel activation. *Jpn J Physiol* 43 Suppl 1: S197-S204, 1993.
188. **Taddei S, Viridis A, Mattei P and Salvetti A.** Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 21: 929-933, 1993.
189. **Thastrup O.** Role of Ca²⁺(+)-ATPases in regulation of cellular Ca²⁺ signalling, as studied with the selective microsomal Ca²⁺(+)-ATPase inhibitor, thapsigargin. *Agents Actions* 29: 8-15, 1990.
190. **Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, Foder B, Cullen PJ, Drobak BK, Bjerrum PJ, Christensen SB and Hanley MR.** Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. 1989. *Agents Actions* 43: 187-193, 1994.
191. **Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S and Laus R.** Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61: 3760-3769, 2001.
192. **Tschudi MR, Mesaros S, Luscher TF and Malinski T.** Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 27: 32-35, 1996.

193. **Tsien RY, Rink TJ and Poenie M.** Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6: 145-157, 1985.
194. **Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K and Takeshita A.** Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin Invest* 100: 2793-2799, 1997.
195. **Vaca L and Kunze DL.** Depletion of intracellular Ca²⁺ stores activates a Ca(2+)-selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol* 267: C920-C925, 1994.
196. **van Zwieten PA, Safar M, Laurent S, Pfaffendorf M, Hendriks MG and Bruning TA.** New insights into the role of endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens* 13: 713-716, 1995.
197. **Vanhoutte PM.** Endothelial dysfunction in hypertension. *J Hypertens Suppl* 14: S83-S93, 1996.
198. **Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Boddling M, Droogmans G and Nilius B.** Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 277: 33704-33710, 2002.
199. **Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T and Nilius B.** Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 396-401, 2004.
200. **Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B, Suzuki M, Janssens A, Voets T, Morisseau C, Hammock BD, Fleming I, Busse R and Nilius B.** Modulation of the Ca²⁺ permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res* 97: 908-915, 2005.
201. **Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G and Nilius B.** Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 47044-47051, 2002.
202. **Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD and Nilius B.** Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* 277: 13569-13577, 2002.

203. **Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T and Nilius B.** Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424: 434-438, 2003.
204. **Watanabe S, Yashiro Y, Mizuno R and Ohhashi T.** Involvement of NO and EDHF in flow-induced vasodilation in isolated hamster cremasteric arterioles. *J Vasc Res* 42: 137-147, 2005.
205. **Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G and Montell C.** TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9652-9656, 1995.
206. **Woolfson RG and Poston L.** Effect of NG-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. *Clin Sci (Lond)* 79: 273-278, 1990.
207. **Wu X, Babnigg G and Villereal ML .** Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca(2+) entry in HEK-293 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C526-C536, 2000.
208. **Yamamoto N, Nomura M, Okubo K, Maeda K and Goto T.** Pharmacologic characterization of FR172516: a new combined calcium channel-blocking and beta-adrenoceptor-blocking agent. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: 587-594, 1999.
209. **Yue L, Peng JB, Hediger MA and Clapham DE.** CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* 410: 705-709, 2001.
210. **Zhang L and Barritt GJ.** TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr Relat Cancer* 13: 27-38, 2006.
211. **Zhou XL, Batiza AF, Loukin SH, Palmer CP, Kung C and Saimi Y.** The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7105-7110, 2003.
212. **Zhu X, Chu PB, Peyton M and Birnbaumer L.** Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene. *FEBS Lett* 373: 193-198, 1995.
213. **Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E and Birnbaumer L.** trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* 85: 661-671, 1996.

214. **Zitt C, Obukhov AG, Strubing C, Zobel A, Kalkbrenner F, Luckhoff A and Schultz G.** Expression of TRPC3 in Chinese hamster ovary cells results in calcium-activated cation currents not related to store depletion. *J Cell Biol* 138: 1333-1341, 1997.
215. **Zubov AI, Kaznacheeva EV, Nikolaev AV, Alexeenko VA, Kiselyov K, Muallem S and Mozhayeva GN.** Regulation of the miniature plasma membrane Ca(2+) channel I(min) by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 274: 25983-25985, 1999.
216. **Zweifach A and Lewis RS.** Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6295-6299, 1993.
217. **Zweifach A and Lewis RS.** Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 270: 14445-14451, 1995.