

Zelluläre Mechanismen der Reningenregulation



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Jürgen Klar, Regensburg

Februar 2003

Promotionsgesuch eingereicht am: 11. Februar 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Kurtz

Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Kunzelmann
1. Prüfer:	Prof. Dr. Kurtz
2. Prüfer:	Prof. Dr. Deutzmann
3. Prüfer:	Prof. Dr. Minuth

Inhaltsverzeichnis

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	4
<u>1 Einleitung</u>	8
1.1 <u>Renin- Angiotensin- Aldosteron System</u>	8
1.2 <u>Die juxtaglomeruläre Zelle</u>	9
1.3 <u>Renin</u>	10
1.4 <u>Reninsekretion</u>	11
1.5 <u>Regulation der Reninsekretion</u>	13
1.5.1 <u>Physiologische Regulation der Reninsekretion</u>	13
1.5.1.1 <u>Salzhaushalt</u>	13
1.5.1.2 <u>Blutdruck bzw. renaler Perfusionsdruck</u>	14
1.5.1.3 <u>Sympathische Nervensystem</u>	15
1.5.1.4 <u>Angiotensin II</u>	15
1.5.1.5 <u>Aldosteron</u>	15
1.5.1.6 <u>Lokal wirkende Substanzen</u>	17
1.5.1.6.1 <u>Stickstoffmonoxid (NO)</u>	17
1.5.1.6.2 <u>Prostaglandine</u>	18
1.5.1.6.3 <u>Tumornekrosefaktor α</u>	18
1.5.1.6.4 <u>Transforming growth factor- beta</u>	18
1.5.2 <u>Zelluläre Regulation der Reninsekretion</u>	20
1.5.2.1 <u>Kalzium und Proteinkinase C</u>	20
1.5.2.2 <u>cAMP</u>	22
1.5.2.3 <u>cGMP</u>	22
1.5.3 <u>Regulation des Reningens</u>	23
1.5.3.1 <u>Transkriptionelle Regulation</u>	24
1.5.3.1.1 <u>Proximal regulatorische Sequenzen</u>	24
1.5.3.1.2 <u>Distale regulatorische Sequenzen (Enhancer)</u>	24
1.5.3.1.3 <u>Silencer Elemente</u>	25
1.5.3.2 <u>Posttranskriptionelle Regulation</u>	26
1.6 <u>Fragestellung</u>	27
<u>2 Material und Methoden</u>	28
2.1 <u>Material</u>	28

2.1.1	Plasmide	28
2.1.2	Oligonukleotide	30
2.1.3	Internetdienste und Software	31
2.1.4	Medien, Puffer und Lösungen	32
2.1.5	Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	34
2.1.6	Geräte	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Kultivierung von Organismen und eukariontischen Zellkulturen	37
2.2.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i> Bakterien	37
2.2.1.2	Anzucht und Kultivierung der As4.1 Zellen	37
2.2.1.3	Isolation und Kultivierung von nativen juxtaglomerulären Zellen	37
2.2.2	Gentechnische Methoden	38
2.2.2.1	Elution von DNA aus Agarosegelen	38
2.2.2.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	39
2.2.2.3	Isolation von genomischer DNA aus eukariontischen Zellen	39
2.2.2.4	DNA-Sequenzanalyse	39
2.2.2.5	Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen	39
2.2.2.6	Einzelstrang cDNA Synthese	40
2.2.2.7	Polymerasekettenreaktion	40
2.2.2.8	In vitro Transkription	40
2.2.2.9	Quantitative Polymerasekettenreaktion	41
2.2.2.10	RNase-Protection Assay	41
2.2.2.11	Gerichteter Basenaustausch	42
2.2.2.12	Erstellen von Deletionskonstrukten	43
2.2.2.13	Gelshift Assay	43
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	43
2.2.3.1	Proteinbestimmung	43
2.2.3.2	Proteinextrakt aus As4.1 Zellen	44
2.2.3.3	Präparation von Kernextrakten	44
2.2.3.4	Auftrennung von Proteinen	44
2.2.3.5	Western Blot Analyse	45
2.2.4	cAMP Konzentrationsbestimmung	45
2.2.5	Bestimmung des Reningehalts	45

2.2.6	Isoliert perfundierte Niere	46
2.2.7	Statistik	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Wirkungsweise des cAMP auf die Reningenexpression	48
3.1.1	cAMP Konzentration in As4.1 Zellen	48
3.1.2	Renin mRNA Konzentration und Prorenin- Sekretion	50
3.1.3	Proteinkinase A	53
3.1.4	Renin mRNA Stabilität	54
3.1.5	Reningentranskription	55
3.1.6	CRE- bindendes Protein	61
3.2	Einfluss und Wirkungsweise von Aldosteron auf die Renin mRNA	65
3.2.1	Expression des Mineralokorticoid- Rezeptors in juxta-glomerulären Zellen	66
3.2.2	Wirkung von Aldosteron auf die Maus JG- Zellen in Primärkultur	67
3.2.3	Wirkung von Aldosteron auf die juxtaglomeruläre Zellline As4.1	69
3.2.4	Mechanismus der Aldosteronwirkung auf die Reningen Expression	73
3.2.5	Interaktion zwischen dem Aldosteron- und dem cAMP Signalweg	75
3.2.6	Wirkung von Aldosteron auf die Reninsekretion in der isoliert perfundierten Niere	77
3.3	Einfluss von TGF-βI und TGF-βII auf die Reningen Expression	79
3.3.1	Expression der Rezeptoren TGF-βI und TGF-βII in JG-Zellen in vitro	80
3.3.2	Die Wirkung von TGF-βI und TGF-βII auf As4.1 Zellen und native JG-Zellen	81
3.3.3	Die Wirkung von TGF-βI und TGF-βII auf die Reningen- Expression	85
3.3.4	Interaktion zwischen TGF-βI/ TGF-βII und dem cAMP Signalweg	86
4	Diskussion	87
4.1	Die Wirkung von cAMP auf die Expression des Reningens	87
4.2	Der direkte Einfluss von Aldosteron auf die Expression des Reningens und die Reninsekretion	92
4.3	Einfluss von TGF-βI und TGF-βII auf die Reningenexpression und Reninsekretion	96
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	101

<u>7</u>	<u>Anhang</u>	116
<u>7.1</u>	<u>Publikationen</u>	116
<u>7.2</u>	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	117
<u>7.3</u>	<u>Danksagung</u>	118

1 Einleitung

1.1 Renin- Angiotensin- Aldosteron System

Das Renin- Angiotensin- Aldosteron System (RAAS) spielt eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung des Salz- und Wasserhaushaltes des Körpers und die Regulation des Blutdrucks. Renin ist eine Protease, die vom im Blutplasma enthaltenen Angiotensinogen das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I abspaltet. Dieses wird durch das Angiotensin- converting enzym (ACE) in das Oktapeptid Angiotensin II überführt. Angiotensin II stellt dabei den eigentlichen biologischen Effektor des Systems dar. Es wirkt vasokonstriktorisch und führt in der Nebenniere zur Ausschüttung und Synthese des Steroidhormons Aldosteron. Aldosteron wiederum führt in der Niere zu einer verstärkten Rückresorption von Kochsalz und Wasser und erhöht dadurch das Blutvolumen und den Blutdruck (Hackenthal, 1990).

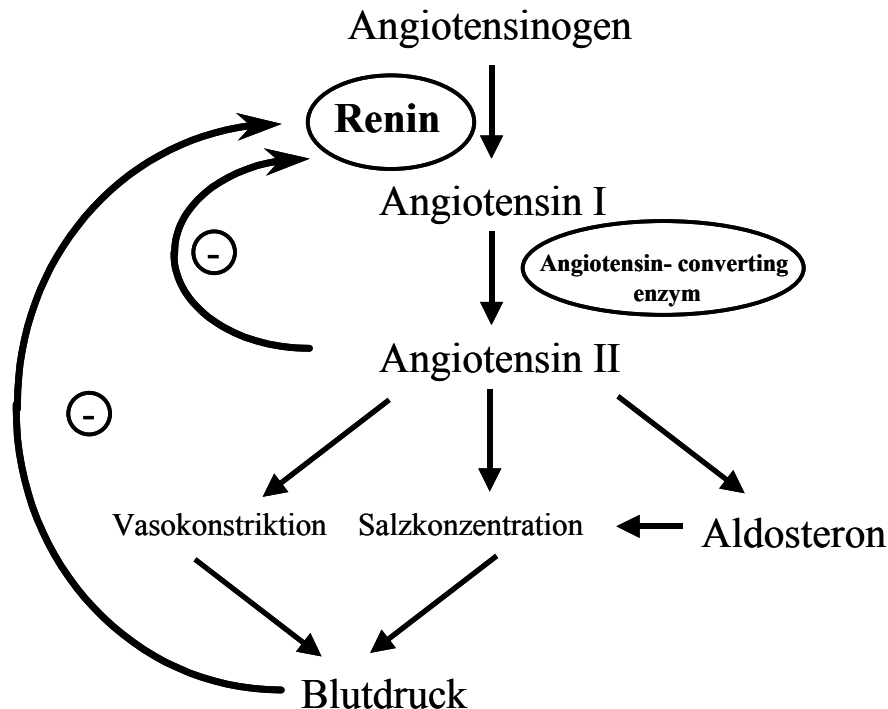


Abbildung 1.1: Übersicht über die Signalkaskade des Renin- Angiotensin- Aldosteronsystems.

Unter physiologischen Bedingungen ist weder die Konzentration des Angiotensinogens noch des Angiotensinogen– Converting Enzyms für die Bildung des Angiotensin II limitierend, so dass die Aktivität des RAAS vor allem durch die Konzentration des Renins im Blut und damit durch die Reninsekretionsrate gesteuert wird (Kurtz, 1989). Das RAAS wird im Sinne eines negativen Feedback Mechanismus reguliert, d.h. sowohl ein erhöhter Blutdruck, eigentlich der erhöhte renale Perfusionsdruck, als auch eine erhöhte Kochsalzkonzentration hemmen die Reninfreisetzung und Reninsynthese. Auch Angiotensin II übt, wie unten weiter aufgeführt, einen direkt hemmenden Effekt auf die Reninsynthese und Reninsekretion aus. (Hackenthal, 1990).

1.2 Die juxtaglomeruläre Zelle

Das im Blutstrom zirkulierende Renin wird in der Niere und dort von den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG- Zellen) gebildet und sezerniert. Diese JG-Zellen befinden sich in der Media- Schicht der afferenten Ateriole in enger Nachbarschaft zu den Gefäßpolen der Glomeruli (Barajas, 1979, Taugner et al., 1984). Die JG- Zellen stehen des weiteren mit den Zellen der sogenannten Macula densa Region in Verbindung, die besondere Zellen des distalen Tubulus darstellen.

JG- Zellen selbst gehen durch eine metaplastische Transformation aus glatten Gefäßmuskelzellen hervor (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984). Im Verlauf dieser Transformation entstehen granuläre Vesikel von unterschiedlicher Größe und Gestalt, welche Renin enthalten, während sich gleichzeitig die Myofibrillen zurückbilden (Taugner et al., 1984). Die Zahl der reninproduzierenden Zellen ist nicht konstant. Bei einer chronischer Stimulation des Reninsystems werden in den afferenten Ateriolen zusätzliche glatte Muskelzellen in reninproduzierende Zellen umgewandelt und in umgekehrter Weise erfolgt eine Umbildung von reninbildenden Zellen in glatte Muskelzellen bei einer chronischen Unterdrückung des Reninsystems. Die diese Transformation auslösenden und kontrollierenden intrazellulären Vorgänge, sind noch nicht bekannt, aber sind höchstwahrscheinlich an die zelluläre Kontrolle der Reninsynthese und Reninsekretion gekoppelt.

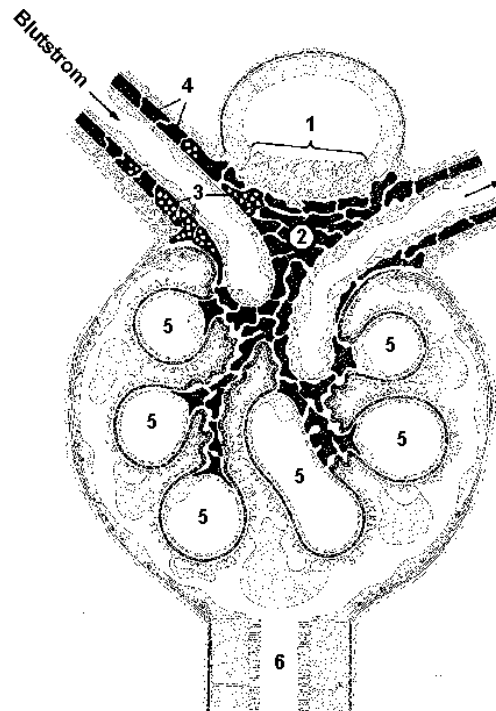


Abbildung 1.1: Graphische Darstellung eines Glomerulus. 1: Macula densa
2: mesangiale Zellen 3: reninproduzierende juxtaglomeruläre Zellen 4: glatte Muskelzellen
5: Glomeruluskapillare 6: Tubulus

1.3 Renin

Die renale Reninsynthese erfolgt in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen. Renin wird dort als Preprorenin transkribiert und translatiert (Barajas, 1979; Taugner et al. 1984). Das Renin wurde in vielen Säugetierspezies charakterisiert. Während das Renin in den meisten untersuchten Spezies, wie Ratte, Maus und Kaninchen aus 9 Exons und 8 Introns besteht, besitzt es im Menschen und im Schaf ein 10 Exon, da dort ein zusätzliches 9bp langes Exon 5A auftritt. Mäuse zeigen unter den Säugetieren eine Besonderheit. Es gibt Mäusestämme, welche, wie alle anderen Spezies, nur ein Renin besitzen, Ren 1^C genannt, und Mäusestämme die zwei Reningene besitzen, Ren 1^D und Ren 2. Alle Reningene befinden sich bei der Maus auf Chromosom 1 und entstanden evolutionär höchstwahrscheinlich aus einem Gen. Das Ren 2 Gen besitzt im Gegensatz zu Ren 1^C und Ren 1^D keine Glykosylierungsstellen (Morris, 1992).

Nach der Prozessierung der Renin mRNA, wird das translatierte Preprorenin unter Abspaltung eines Signalpeptides in das endoplasmatische Retikulum transloziert und es

erfolgt dort die Bildung des enzymatisch inaktiven Prorenins (Hackenthal et al., 1990; Morris, 1992; Morris, 1996; Tamura et al., 1995). Dieses Protein wird in den JG- Zellen lysosomalen Enzymen gleich durch den Golgi Apparat transportiert. Es wird entweder konstitutiv sezerniert oder nach der Glykosylierung und dem Anhängen eines Mannose-6 Phosphatrestes in lysosomenähnliche sekretorische Vesikel verpackt. Die Überführung des Prorenins in das aktive Renin erfolgt in den Vesikel durch eine N-terminale Verkürzung, wobei jedoch bis dato das die Reaktion durchführende Enzym noch nicht näher charakterisiert wurde (Panthier et al., 1982; Catanzaro et al., 1983; Hirose et al., 1985; Dzau et al., 1988). Als potentielle Kandidaten für diesen Aktivierungsschritt werden Kallikrein (Kikkawa et al., 1998), Cathepsin B (Hackenthal et al., 1990, Jutras et al., 1999) bzw. die Proprotein- Convertase (PC5) (Laframboise et al., 1997) diskutiert. Die Glykosylierung des Renins wird nicht nur für das Verpacken in die sekretorischen Vesikel verantwortlich gemacht, sondern auch, wie an Renin-knockout Mäusen gezeigt wurde, für die Ausbildung der Vesikel selbst (Clark et al., 1997). In Ren 1^D knockout Mäusen wird zwar Ren 2 exprimiert und konstitutiv sezerniert, jedoch bilden sich keine sekretorischen Vesikel. Bei einer Ren 2 knockout Maus hingegen bilden sich normale Renin- sezernierende Vesikel in den JG- Zellen (Clark et al., 1997; Sharp et al., 1996). Da wie erwähnt, dem Ren 2 Protein potentielle Glykosylierungsstellen fehlen, so dass die Glykosylierung mit Mannose- 6- Phosphat unterbleibt, wurde aus diesen Befunden geschlossen, dass die Glykosylierung ein wichtiger Schritt für die Ausbildung der sekretorischen Reninvesikel ist.

1.4 Reninsekretion

Die Reninsekretionsrate aus den JG- Zellen kann sich innerhalb weniger Minuten schnell ändern. Obwohl zunächst kontrovers diskutiert, sprechen zahlreiche Befunde für eine Reninfreisetzung auf dem Weg der Exocytose. Die Exocytose des Renins erfolgt eher in Quanten als kontinuierlich (Skott, 1986). Es wurde außerdem in JG- Zellen die Fusion der Reninvesikel mit der Plasmamembran gezeigt (Taugner et al., 1984).

Die Exocytose des Renins beginnt, wie die Exocytose in anderen sekretorischen Zellen, mit dem Anschwellen der Vesikel. Eine Besonderheit bei den JG- Zellen ist, dass das Anschwellen der Vesikel vor der Ausbildung der Fusionspore erfolgen muss (Skott und

Taugner, 1987). Die Sekretion von Renin aus den JG- Zellen ist gegenüber einer Änderung der Osmolarität sensitiv, in der Weise, dass die Reninsekretionsrate sich umgekehrt zur extrazellulären Osmolarität verhält (Skott, 1988). Dabei führt eine Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität zu einem Ansteigen des Volumens der Zelle und der Vesikel, wobei ein Anschwellen der Vesikel die Fusion mit der Plasmamembran und damit die Reninsekretion fördert. Da die Reninsekretion in permeabilisierten Zellen von der Osmolarität abhängig bleibt, wurde vermutet, dass weniger das Zellvolumen als vielmehr das Vesikelvolumen für die Reninsekretion verantwortlich ist. Das Vesikelvolumen könnte chemoosmotisch durch einen KCl Einstrom kontrolliert werden, wobei der KCl Einstrom durch die Aktivität einer Protonenpumpe und eines K^+ / H^+ Austauscher kontrolliert werden könnte (King und Fray, 1994).

Neben dem Vesikelvolumen kann ebenso das Cytoskelett der Zelle die Exocytose regulieren. JG- Zellen, welche umgewandelte glatte Gefäßmuskelzellen sind, besitzen Aktin- und Myosinfilamente, welche an die Plasmamembran verlagert wurden. Dort bilden sie ein unter der Plasmamembran angeordnetes Aktin- Myosin Netzwerk aus, welches als mechanischer Regulator der Reninsekretion wirken könnte. So könnte eine Aktivierung der Myosin-Leichtketten Kinase und eine Kontraktion der JG- Zellen die Reninsekretion durch eine mechanische Behinderung der Vesikelfusion mit der Plasmamembran hemmen (Park et al., 1996; Ogawa et al., 1995).

1.5 Regulation der Reninsekretion

1.5.1 Physiologische Regulation der Reninsekretion

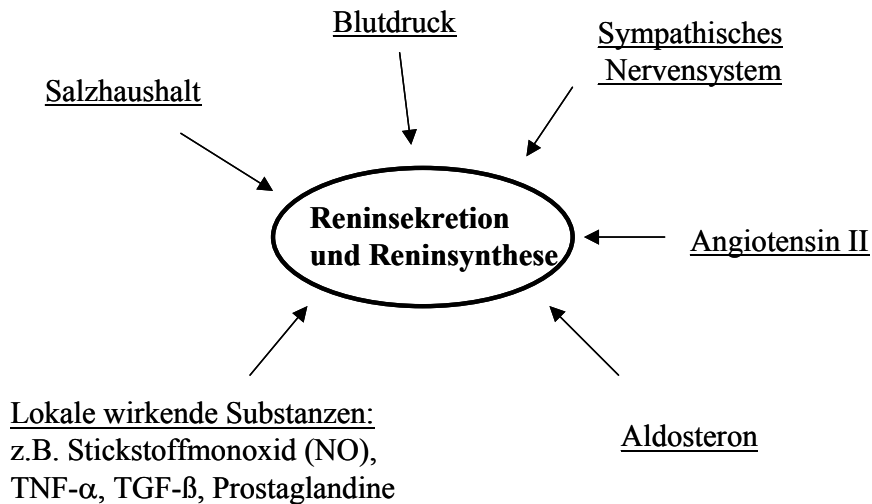


Abbildung 1.3: Überblick über die wichtigsten Regulatoren der Reninsekretion und Reninsynthese

1.5.1.1 Salzhaushalt

Die Kochsalzaufnahme des Körpers stellt einen zentralen Regulator der Reninsekretion und Reninsynthese dar. Dabei führt eine vermehrte Kochsalzaufnahme zu einer Hemmung des Reninsystems, während eine kochsalzarme Ernährung zu einer Stimulation führt. Wie schon Goormaghtigh et al. (1937) und Vander et al. (1967) postulierten, spielt die sogenannte Macula densa der Niere bei der kochsalzhaltigen Regulation des Reninssystems eine wesentliche Rolle. Bei der Macula densa handelt es

sich um spezialisierte Zellen des distalen Tubulus, die in engen Kontakt mit der afferenten Ateriole des selben Nephrons treten. Diese Zellen sind in der Lage die Kochsalzkonzentration der Tubulusflüssigkeit, welche sich parallel zur Kochsalzaufnahme des Körpers ändert, zu detektieren und über bisher nicht aufgeklärte extrazelluläre Signalwege die Reninsynthese und die Reninsekretion über die JG- Zellen zu steuern. Da in den Macula densa Zellen die Cyclooxygenase II (COX II) (Harris et al., 1994) sowie die neuronale Stickstoffmonoxid- Synthase (nNOS) (Mundel et al., 1992) exprimiert werden und deren Produkte; nämlich, Prostaglandin E₂ sowie Stickstoffmonoxid (NO) stimulierend auf das Reninsystem einwirken, könnten beide Enzyme in der Vermittlung des Macula densa Signals zur JG- Zelle beteiligt sein. (Harris et al., 1994; Schricker et al., 1996; Singh et al., 1996; Weisman et al., 1986).

1.5.1.2 Blutdruck bzw. renaler Perfusionsdruck

Der renale Perfusionsdruck ist ein starker Regulator der Reninsekretion und Reninsynthese. Ein Abfall des Blutdrucks bewirkt dabei über eine Reduktion des renalen Perfusionsdrucks einen Anstieg der Reninsekretion bzw. der Reninsynthese. Da diese druckabhängige Regulation auch in der isolierten perfundierten Niere erhalten bleibt, muss der dafür verantwortliche Drucksensor in der Niere selbst lokalisiert sein (Scholz et al., 1994). Hier sei jedoch angemerkt, dass auch die tubuläre Natriumkonzentration, welche mit steigendem Blutdruck zunimmt, über den oben genannten Mechanismus einen indirekten Einfluss auf die Reninsekretion ausübt. (Scholz et al., 1993; Schricker et al., 1993). Es gibt aber ausreichend Befunde, dass eine weitere in den Gefäßen lokalisierte Komponente, die als Barorezeptor bezeichnet wurde, bei der Regulation der Reninsekretion durch den renalen Perfusionsdruck mitwirkt. Die Wirkungsweise dieses Barorezeptors ist noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass der intraluminale Druck die Wandspannung der Gefäße verändert und damit die JG- Zelle gedehnt wird (Fray, 1976). Diese These wird von den Befunden unterstützt, dass das Dehnen von isolierten JG- Zellen die Reninsekretion und die Reninexpression hemmt (Carey et al., 1997)

1.5.1.3 Sympathische Nervensystem

Die reninproduzierenden JG- Zellen werden durch das sympathische Nervensystem innerviert. Die sympathischen Nervenenden werden in enger Nachbarschaft zu den JG-Zellen gefunden, welche wiederum β_1 - adrenerge Rezeptoren tragen. Die Stimulation dieser Rezeptoren durch zirkulierende oder lokal sezernierte Katecholamine aktiviert die Adenylatzyklase, welches zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration führt und dadurch die Reninsynthese und die Reninsekretion stimuliert (Holmer et. al. 1997; Kurtz, 1997). Jedoch werden dadurch nur JG- Zellen zur Reninsekretion angeregt, die eng benachbart zum juxtaglomerulären Apparat liegen (Wagner et al. 1999). Glatte Muskelzellen, die an anderen Stellen der afferenten Ateriole liegen und Reninvesikel haben, können dadurch nicht zur Sekretion angeregt werden. Ebenso können keine neuen Zellen durch Katecholamine zur Reninproduktion rekrutiert werden (Holmer et al., 1997).

1.5.1.4 Angiotensin II

Die Hemmung der Reninsekretion und Reninsynthese durch Angiotensin II wird über die AT1 Rezeptoren der JG- Zellen vermittelt. Ein direkter inhibitorischer Effekt des Angiotensin II konnte auch in vivo anhand von Angiotensin II Antagonisten und Angiotensinogen- converting Enzym Blockern gezeigt werden (Campbell et al., 1996). Eine indirekte Wirkung des Angiotensin II über das sympathische Nervensystem wurde dabei ausgeschlossen (Wagner et al., 1997). Angiotensin II vermittelt seinen Einfluss auf die Reninsekretion und Reninsynthese intrazellulär über die Aktivierung der Phospholipase C, welche wiederum die Ca^{2+} - Konzentration erhöht und die Proteinkinase C aktiviert (Kurtz und Penner, 1989).

1.5.1.5 Aldosteron

Aldosteron, ein C- 21- Steroid, wird in der Nebenniere in der Zona glomerulosa gebildet. Die Freisetzung von Aldosteron wird vor allem durch das Angiotensin II stimuliert. Ferner lassen auch ein Natriummangel und ein Kaliumanstieg im Blut, oder eine ACTH- Ausschüttung die Aldosteronsekretion steigen. Aldosteron wiederum

fördert im distalen Nephron die Rückresorption von Na^+ und wirkt damit Wasser und Salz retenierend und blutdrucksteigernd. Wichtige Effektorgene des Aldosterons in diesem Zusammenhang sind der luminale epitheliale Na^+ Kanal (ENaC), der sekretorische K^+ Kanal, der Na^+/H^+ Austauscher und die Na^+/K^+ ATPase (Stockand, 2002). Eine Fehlfunktion der Aldosteronfreisetzung spielt bei einer Vielzahl von humanen Erkrankungen eine wichtige Rolle, die mit einer Störung des Wasser-Elektrolyt- Haushaltes einhergehen (Überblick: Lifton RP et al., 2001).

Aldosteron vermittelt einen Grossteil seiner physiologischen Wirkung über die Modulation der Genexpression. Dies führt zu einer zeitlichen Verzögerung von etwa 0,5 bis 1 h bis der Effekt messbar ist. Es gibt jedoch auch durch Aldosteron vermittelte Vorgänge, die schnell ($< 1\text{min}$) ausgelöst werden. Diese werden über einen nicht-genomischen Prozess vermittelt, der auf der Aktivität von speziellen Kinase beruht. Dabei kann oft ein und das selbe Protein durch einen genomischen Effekt und durch einen nicht- genomischen Effekt beeinflusst werden, wie z.B: der epitheliale Na^+ Kanal (ENaC) (Wehling, 1997).

Die Genaktivierung durch Aldosteron erfolgt durch die Bindung des Steroids, welches auf Grund seines Lipidcharakters membrangängig ist, an den cytosolischen Rezeptor. Dieser Rezeptor ist für Aldosteron hauptsächlich der Mineralokortikoidrezeptor (MR), jedoch kann auch eine Bindung an den Glucocorticoidrezeptor (GR) erfolgen, wenn auch mit einer geringeren Affinität als an den Mineralokortikoidrezeptor (Fuller et al., 2000). An den Rezeptor gebunden, wird der Aldosteron-Mineralokortikoidrezeptorkomplex bzw. Aldosteron- Glucocorticoidrezeptorkomplex in den Kern transloziert und fungiert dort als Transkriptionsfaktor. Als Interaktionsdomäne mit der DNA nutzen beide Komplexe das steroid- response element (SRE) (Stockand, 2002).

In den letzten Jahren wurden vermehrt Aldosteron- bindende Proteine beschrieben, die einen schnellen, nicht- genomischen Aldosteroneffekt vermitteln können, wie z.B. die Serum- und Glucocorticoid- induzierbaren Kinasen (sgk) oder das monomere Kirsten Ras- GTP bindende Protein (Ki-ras). Die Sgks sind Serin/ Threonin Kinasen, welche eine hohe Homologie zur Proteinkinase B/ Akt zeigen. Sgks aktivieren Proteine durch Phosphorylierung an spezifischen Konsensussequenzen, die ähnlich zu den Aktivierungsdomänen der Proteinkinase B/ Akt und der Proteinkinase C sind. Die Aktivität der Sgks selbst wird ebenfalls durch Phosphorylierung gesteuert.

Interessanterweise erhöht Aldosteron sowohl die Sgk Aktivität als auch die Sgk-Proteinmenge (Wang et al., 2001). Die Ki-ras wirkt höchstwahrscheinlich über die Aktivierung der Mitogen- aktivierten Proteinkinase (MAPK) Kaskade (Spindler et al., 1997).

1.5.1.6 Lokal wirkende Substanzen

Neben den systemisch wirkenden Effektoren, sind auch noch zahlreiche andere lokal wirkende Substanzen bekannt, die die Reninsekretion und Reninsynthese beeinflussen. Stimulatoren des RAAS sind z.B. Bradykinin, das Calcitonin gene related peptide, Dopamin, Adrenomedullin, Stickstoffmonoxid oder die Prostaglandine (Keeton und Campbell, 1981; Kurtz et al., 1988; Kurtz et al., 1989; Jensen et al., 1997). Hemmenden Einfluss auf das RAAS hingegen haben Substanzen wie z.B. Adenosin, Arginin-Vasopression, Platelet activating factor (PAF) oder TNF- α und sehr wahrscheinlich auch TGF- β II (Keeton und Campell, 1981; Pfeilschifter et al., 1985, Kurtz et al, 1988, Todorov et al., 2002; Pietri et al., 2002). Auf einige wenige wird im folgendem näher eingegangen.

1.5.1.6.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Die juxtaglomeruläre NO Bildung findet in den Endothelzellen der afferenten Ateriole durch die dort exprimierte endotheliale NO- Synthase (eNOS) (Bachmann et al., 1995) und durch die in den Macula densa Zellen exprimierte neuronale NO- Synthase statt (Mundel et al., 1992). Für die eNOS wurde bis jetzt noch keine Regulation festgestellt, während für die nNOS eine klare Erhöhung der Expression bei Nidrigsalz und eine Erniedrigung der Expression bei einer Arterienstenose gefunden wurde (Schricker et al., 1996; Weisman et al., 1986; Bosse et al., 1995). Der Einfluss von NO auf die Reninsekretion und Reninsynthese ist, trotz widersprüchlicher Ergebnisse, überwiegend stimulatorisch. So wurde gezeigt, dass NO in der isoliert perfundierten Niere die Reninsekretion durch die Aktivierung eines cGMP/ cGMP- Kinase vermittelten Signalweges inhibiert, aber gleichzeitig über den cAMP/ cAMP- Kinase vermittelten Signalweg die Reninfreisetzung stimulieren kann (Kurtz et al., 1998). Die Stimulation

von NO über den cAMP- vermittelten Signalweg beruht auf einer durch NO hervorgerufenen Erhöhung der cGMP Konzentration, was zu einem vermindertem Abbau von cAMP durch die Hemmung der Phosphodiesterase 3 führt (Chiu et al., 1996).

1.5.1.6.2 Prostaglandine

Prostaglandine werden in der juxtaglomerulären Region von verschiedenen Zellentypen gebildet z.B. den Endothelzellen der afferenten Ateriole, den Tubuluszellen des aufsteigenden Teils der Henleschleife eingeschlossen der Macula densa (Komhoff et al., 1997). Die Bildung von Prostaglandinen wird durch die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration vermittelt und ist streng von der Salzkonzentration abhängig (Harris et al., 1994; Jensen und Kurtz; 1997). So schwächte die pharmakologische Inhibierung der Prostaglandinbildung in vivo die durch eine niedrige Salzkonzentration ausgelöste Reninsekretion ab (Schricker und Kurtz, 1996).

1.5.1.6.3 Tumornekrosefaktor α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist ein wichtiger Mediator der Immunantwort und spielt eine bedeutsame Rolle bei Entzündungsreaktion. Ebenso ist TNF- α z.B. an der Ausbildung der Gefäße und an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt (Kapadia et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α die Reninsynthese beeinflusst, aber keinen direkten Effekt auf die Reninsekretion hat (Todorov et al., 2002).

1.5.1.6.4 Transforming growth factor- beta

Der Transforming growth factors- beta (TGF- β) gehört zu einer Superfamilie von Wachstumsfaktoren, welche aus mehr als 30 verschiedenen Protein besteht, darunter TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 aber auch die bone morphogenic proteins (BMPs), die Müllerian- inhibierende Substanz, die Aktivine und die Inhibine. Erste Befunde zeigten, dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung haben (Massague et al., 2000, Derynck et al., 2001; Miyazono et

al., 2000) Darüberhinaus spielt TGF- β aber auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung humaner renaler Erkrankungen, z.B. der renalen Fibrogenese (Yoskiaka et al., 1993) Im humanen Glomerulus wird eine verstärkte Expression des TGF- β Proteins bei vermehrter Ansammlung von Matixproteinen und während der diabetischen Nephropathie gefunden (Yoskiaka et al., 1993). Bei einer in vivo Transfektion des TGF- β 1 Gens in die Rattenniere bildete sich eine glomeruläre Sklerose (Isaka et al., 1993) während die transfizierte Antisense RNA des TGF- β Gens eine Nephropathie verursachte (Akagi et al., 1996).

Des weiteren zeigen heterozygote TGF- β II knockout Mäuse, welche eine zweifach niedrigere TGF- β II mRNA Abundanz zeigen als Wildtyp- Mäuse, eine erhöhte Renin mRNA Konzentration. Woraus auf einen hemmenden Einfluss von TGF- β auf die Renin mRNA geschlossen wurde (Pietri et al., 2002).

In der Mäuseniere wurde TGF- β I im distalen Tubulus als auch im Glomerulus immunhistologisch lokalisiert (Thompson et al., 1989). Die Expression der mRNA sowohl von TGF- β I als auch TGF- β II wurde im humanen Glomeruli nachgewiesen (MacKay et al., 1990). Des weiteren wurde eine Co- Expression der Rezeptoren für TGF- β mit den reninproduzierenden JG- Zellen während der Nierenentwicklung in der Ratte gezeigt (Liu und Ballermann, 1998).

Die intrazelluläre Signalübertragung des TGF- β unterscheidet sich von der anderer Wachstumsfaktoren wie z.B. den epidermal growth factor (EGF), dem platelet- derived growth factor (PDGF) oder den basic fibroblast growth factor (bFGF), welcher initial über eine Rezeptor Tyrosinkinase vermittelt wird. Sowohl TGF- β I als auch TGF- β II agieren über Serin/ Threonin Rezeptorkinasen (Piek et al., 1999). Sie bilden mit den membranassoziierten TGF- β Rezeptorkinasen des Typs I (TGF- β R1) und des Typs II (TGF- β R2) einen heterotetrameren Transmembrankomplex der aus je zwei Rezeptoren des Typs 1 und des Typs 2 besteht. Durch das Binden von TGF- β wird ein stabiler Komplex gebildet, welcher eine cytoplasmatische Autophosphorylierung des TGF- β R2 und eine Phosphorylierung des TGF- β R1 durch den TGF- β R2 auslöst. Für den TGF- β Rezeptortyps 1 sind bisher 8 Isoformen und für den TGF- β Rezeptortyp 2 sind 5 verschiedenen Isoformen bekannt. Daraus ergibt sich eine große Anzahl an verschiedenen Rezeptor- Ligand Komplexen, welche zellspezifisch exprimiert werden (Roberts et al., 2000).

Nach der Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domänen des TGF- β R1 und TGF- β R2 erfolgt eine Aktivierung der als Smad bekannten Transkriptionsfaktoren. Die Familie der Smad- Transkriptionsfaktoren setzt sich aus drei verschiedenen Gruppen zusammen: den Rezeptor regulierten Smads (R-Smad), den als Vermittler fungierenden Smads (C- Smads) und den inhibitorischen wirkenden Smads (I- Smads) (Heldin et al., 1997; Attisano et al., 1998). Der tetramere Komplex aus TGF- β R1 und TGF- β R2 phosphoryliert wiederum die R- Smads. Die R- Smads liegen im Cytosol der Zelle als inaktive Transkriptionsfaktoren vor und können erst an den aktivierten TGF- β Rezeptorkomplex binden. Die Phosphorylierung der R- Smads erfolgt an einem c-terminal gelegenen Motiv aus drei Serinresten durch die Serin/ Threonin-Kinaseaktivität des TGF- β Rezeptorkomplexes. Das phosphorylierte R- Smad löst sich vom Rezeptorkomplex und kann nun eine Interaktion mit den C- Smads eingehen. Dieser R- Smad/ C- Smad- Komplex diffundiert in den Zellkern und wirkt dort als Transkriptionfaktor (Massangué und Chen, 2000). Die I-Smads sind stark homolog zu den R- Smads, jedoch fehlt ihnen die c-terminale Aktivierungsdomäne. Ihre Inhibitorische Wirkung vermitteln sie über das Binden an den TGF- β Rezeptorkomplex.

1.5.2 Zelluläre Regulation der Reninsekretion

1.5.2.1 Kalzium und Proteinkinase C

Die cytosolische Kalzium (Ca^{2+})- Konzentration allein oder in Verbindung mit der Proteinkinase C (PKC) Aktivität ist ein wichtiger Regulator der Reninsekretion. Im Gegensatz zu anderen sekretorischen Zellen, in denen eine Aktivierung der PKC oder ein Anstieg der Ca^{2+} - Konzentration stimulatorisch auf die Sekretion wirken, hemmen sie die Reninsekretion in JG- Zellen. Diese ungewöhnliche Rolle der PKC/ Ca^{2+} - Konzentration wird als das Kalzium Paradoxon der Reninsekretion bezeichnet. So hemmen Hormone wie z.B. Angiotensin II, welches die Phospholipase C aktiviert und damit die Ca^{2+} - Konzentration und die PKC Aktivität erhöht, genauso wie Vasopressin

und die Endotheline die Reninsekretion (Hackenthal et al., 1990, Kurtz et al., 1986; Ritthaler et al., 1995; Müller et al., 2002). Der inhibitorische Effekt dieser Hormone kann durch eine Erniedrigung der intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration abgeschwächt werden. Durch eine Erniedrigung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wird die Reninsekretion hingegen stark stimuliert (Ritthaler et al., 1995; Scholz et al., 1994; Vanongen und Peart, 1974). In gleicher Weise aktivieren Inhibitoren der Ca^{2+} /Calmodulin Aktivität die Reninsekretion, was eine Beteiligung des Ca^{2+} /Calmodulins an der Ca^{2+} -vermittelten Inhibierung der Reninsekretion nahe legt (Schwertschlag und Hackenthal, 1983; dellaBruna et al., 1992). Der inhibitorische Effekt von Ca^{2+} unterbleibt in permeabilisierten JG- Zellen, was darauf schliessen lässt, das die Zellen für die Vermittlung des Ca^{2+} - Signals elektrisch intakt sein müssen. In permeabilisierten Zellen steigt vielmehr bei einer hohen Ca^{2+} -Konzentration die Reninsekretion, was dem typischen Effekt von Ca^{2+} bei anderen sekretorischen Zellen entspricht (Jensen und Skott, 1994). Eine Verknüpfung zwischen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und den elektrischen Eigenschaften der JG- Zellen ergibt sich aus der Existenz von Ca^{2+} -aktivierten Chloridkanälen und wahrscheinlich von Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanälen (Kurtz und Penner, 1989). Das Ruhepotential der JG- Zellen ist positiver als das K^+ -Gleichgewichtspotential und negativer als das Cl^- -Gleichgewichtspotential, so dass man annehmen kann, dass der elektroneutrale Ausstrom von KCl durch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration gesteuert wird (Bührle et al., 1995; Loutzenhiser et al., 1997). Ein Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration könnte somit die cytosolische KCl Konzentration erniedrigen, welche wiederum für das Anschwellen der Vesikel verantwortlich ist. Des weiteren stimuliert Cl^- die Sekretion von Renin und der Ca^{2+} induziert hemmende Effekt auf die Reninsekretion wird durch die Blockade von Chloridkanälen deutlich abgeschwächt (Skott and Jensen, 1992). Die durch Ca^{2+} -vermittelte Änderung der K^+ und Cl^- Konzentration erklären aber nicht die Calmodulin vermittelte Inhibierung der Reninsekretion. Dies kann über eine Regulation der Myosin Leichtketten Kinase durch Ca^{2+} /Calmodulin erklärt werden (Park et al., 1996). Ob jedoch die Ausbildung des Aktin- Myosin Netzwerks an der Plasmamembran oder ein direkter Effekt auf die Reninvesikel dafür verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. Ca^{2+} aktiviert aber auch die Proteinkinase C (PKC), welche wiederum die Reninsekretion hemmt. So wurde gezeigt, dass Phorbol ester, welche die Proteinkinase C aktivieren, die Sekretion von Renin inhibieren. Des weiteren konnte der inhibierende

Effekt von Hormonen, welche über die Phospholipase C die Reninsekretion hemmen, durch PKC- Blocker abgeschwächt werden (Churchill und Churchill, 1984; Kurtz et al., 1986; Ritthaler et al., 1996; Müller et al., 2002). Die PKC kann außerdem über eine Stabilisierung des Aktin- Myosin Netzwerks oder über eine Stimulation des Na^+/H^+ Austauschers die Reninsekretion inhibieren. So konnte eine Hemmung dieses Austausches den inhibitorischen Effekt von Angiotensin II auf die Sekretion von Renin aus JG- Zellen abschwächen (Kurtz et al., 1991).

1.5.2.2 cAMP

cAMP vermittelt den stimulatorischen Einfluss auf die Reninsekretion in JG- Zellen, welcher durch eine Aktivierung der β - adrenergen Rezeptoren, durch Dopamin, durch das Calcitonin- gene-related Peptid, durch Prostaglandin E_2 und durch Prostacyclin ausgelöst wird (Kurtz et al., 1989). Die Wirkung von cAMP erfolgt sehr wahrscheinlich durch eine Stimulation der Proteinkinase A. Die cAMP- Phosphodiesterasen (PDE), im Besonderen die Isoformen PDE-3 und PDE- 4, sind in die Regulation der intrazellulären cAMP Konzentration und somit in die Regulation der Reninsekretion eingebunden (Chiu and Reid, 1996; Kurtz et al., 1998). Des weiteren wird angenommen, dass die Proteinkinase A eine Protonenpumpe in den Reninvesikeln aktivieren kann, was einen Anstieg des Protonengradienten und somit einen K^+ Einstrom in die Vesikel über den K^+/H^+ Austauscher auslöst (King und Fray, 1994). Dabei wird vermutet, dass dies zum Anschwellen der Vesikel führt. Des weiteren wirkt cAMP in glatten Muskelzellen relaxierend durch eine Hemmung der kontraktiellen Elemente. Somit ist es vorstellbar, dass cAMP auch in JG- Zellen das Aktin-Myosin-Netzwerk relaxiert und somit die Reninsekretion begünstigt. Es gibt Hinweise, dass cAMP die cytosolische Konzentration von Ca^{2+} in JG- Zellen beeinflussen und somit den inhibitorischen Effekt der durch Ca^{2+} abmildern kann (Kurtz et al., 1989).

1.5.2.3 cGMP

Die Beteiligung des second messenger cGMP an der Regulation der Reninsekretion wurde mehrfach beschrieben (Kurtz, 1989; Reid und Chiu, 1995; Romero, 1992).

Jedoch wird die genau Rolle des cGMPs in diesen Zusammenhang kontrovers diskutiert. Eine Aktivierung der Guanylatzyklase durch das endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) bzw. durch das atriale Natriuretische Peptid (ANP) und die daraus resultierende erhöhte cGMP- Konzentration kann in vivo und in vitro sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch auf die Reninsekretion wirken.

1.5.3 Regulation des Reningens

Die auffälligste Eigenschaft der Reningentranskription ist die starke Induzierbarkeit durch cAMP, welches wohl den wichtigsten intrazellulären Regulator der Reningenexpression darstellt. Des weiteren ist die Expression des Reningens gewebespezifisch, mit Ausnahme der Mäusestämme, welche zusätzlich das Ren-2 Gen tragen, welches vor allem in der Speicheldrüse exprimiert wird (Kon et al., 1999). Die höchste Expression des Reningens liegt jedoch in allen bisher untersuchten Säugetieren in der Niere und dort ausschließlich in den JG- Zellen. Eine geringere Expression des Reningens wurde auch für anderen Gewebetypen beschrieben, wobei es dort eine wichtige physiologische Funktion in der Aufrechterhaltung des lokalen organspezifischen Renin- Angiotensin Systems ausübt (Morris, 1996; Campbell, 1987; Phillips et al., 1993; Bader et al., 1994a; Bader et al., 1994b, Paul et al., 1992).

Untersuchungen der Reningentranskription erwiesen sich bisher als äußerst schwierig, da ein geeignetes Zellkulturmodell fehlte. In den bisherigen Experimenten wurden deshalb hauptsächlich reninproduzierende Zelllinien aus nicht renalem Gewebe benutzt oder Zelllinien, welche Renin endogen überhaupt nicht exprimieren. Diese Zellen wurden für die Untersuchung der Reningenexpression mit Reninpromotor-Reporterkonstrukten transfiziert. Die vor kurzem neu etablierte Zelllinie As4.1 ähnelt den JG- Zellen und sezerniert Renin ins Kulturmedium. Diese Zelllinie wurde aus C57Black 6 Mäusen isoliert, die das SV40 Antigen unter der Kontrolle des Ren-2 Genpromotors exprimieren (Sigmund et al., 1990; Jones et al., 1997).

1.5.3.1 Transkriptionelle Regulation

1.5.3.1.1 Proximal regulatorische Sequenzen

In verschiedenen Spezies wurden bereits einige cAMP- responsive elements (CRE) in der proximal gelegenen Promotorregion beschrieben (Tamura et al., 1995). An der Position –226 bis –219 wurde im humanen Reningen ein CRE gefunden und es wurde gezeigt, dass dieses Element in Chorionzellen (Germain et al., 1996; Germain et al., 1997) und Calu-6 Lungenkarzinomzellen (Germain et al., 1997; Ying et al., 1997) funktionell aktiv ist, wenn das CRE bindende Protein (CREB) mit dieser Stelle interagiert. Es wurde weiterhin gezeigt, dass für die optimale Aktivität dieses CRE ein DNA Element an der Stelle –76 bis –78 vorhanden sein muss. Diese Stelle weist große Homologien zu einer als POU bekannten Domäne auf an die Transkriptionsfaktoren binden können (Germain et al., 1996; Germain et al., 1997; Ying et al., 1997; Sun et al., 1994; Borensztein et al., 1994; Gilbert et al., 1994). Ein dazu analoges Element, welches ebenso an der cAMP vermittelte Regulation des Reningens beteiligt ist, wurde im proximalen Promotor des murinen Ren-1^C Gens (RP-2, -75 bis –46) beschrieben (Tamura et al., 1994; Tamura et al., 1992).

Ebenfalls im Ren 1^C Promotor wurde ein AP-1 Element (RC, -36 bis –20) direkt neben der Transkriptionsstartstelle beschrieben, an welches c-jun bindet und wahrscheinlich in die basale Regulation des Reningens involviert ist (Tamura et al., 1993; Tamura et al., 1998). Ein weiteres CRE wurde stromaufwärts im Ren 1^D Promotor (-626 bis –599) gefunden. Dieses CRE ist an der gewebespezifische Expression des Reningens durch eine Interaktion mit den überlappenden negativ regulierenden Element (NRE, -607 bis 589) beteiligt (Horiuchi et al., 1991; Barrett et al., 1992; Horiuchi et al., 1993; Yamada et al., 1995; Tomita et al., 2000).

1.5.3.1.2 Distale regulatorische Sequenzen (Enhancer)

Versuche an transgenen Tieren zeigten, dass für die gewebespezifische Expression des murinen Ren-2 Gens sowohl DNA Sequenzen im Promotorbereich als auch Sequenzabschnitte im transkribierten Bereich nötig sind. Expressionskonstrukte mit 5.3kb (Mullins et al., 1989) oder 2.5kb (Tronik et al., 1987; Tronik et al., 1988) der

Promotorsequenz und zusätzlich allen Exons und Introns des Ren-2 Gens oder 4.6kb der Promotorsequenz gewährleisten, die für das Reningen gewebespezifische Expression des Reportergens (SV40 Antigen), in den Nieren, Genitalien, Speicheldrüsen und der Nebenniere. Jedoch ein Expressionskonstrukt mit nur 2.5kb der Promotorsequenz und dem selben Reportergen führte zu einer ektopischen Expression (Sola et al., 1989). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl DNA Sequenzen im Bereich der 2.5kb des Reninpromotors als auch zusätzliche Bereiche im transkribierten Bereich für die gewebespezifische Expression des Reningens verantwortlich sind. In letzter Zeit wurden auch regulatorische Sequenzabschnitte, die für die gewebespezifische Expression verantwortlich sind beschrieben. Für das murine Ren 1^C Gen wurde an Position –2866 bis -2625 eine sogenannte Enhancer Struktur gefunden, welche eine gewebespezifische Expression des Reningens sicherstellt (Petrovic et al., 1996). Im humanen Reninpromotor wurden zu dieser Sequenz homologe Strukturen an der Position –5777 bis 5552 (Germain et al., 1998) beschrieben und eine 12kb von der Transkriptionsstartstelle entfernte regulatorische Sequenz identifiziert (Yan et al., 1997; Shi et al., 1999).

Ebenfalls wurde im Enhancer des murinen Ren 1^C Gens zwei RXR/ RAR Bindestelle von –2674 bis –2667 und von –2657 bis –2650 vor der Transkriptionsstartstelle beschrieben. An diese Stelle binden die durch Vitamin A aktivierten Transkriptionsfaktoren RXR und RAR (Shi et al., 2001).

1.5.3.1.3 Silencer Elemente

Mit transgenen Tierexperimenten konnten transkriptionell regulatorische Elemente im transkribierten Bereich des Reningens gefunden werden, die die Expression des Reningens inhibieren. Vor allem der Sequenzbereich des Intron I, welches große Homologien zwischen den einzelnen Spezies aufweist, scheint Erkennungssequenzen zu besitzen, an die Transkriptionsfaktoren binden, die die Regulation des Reningens unterdrücken (Germain et al., 1999; Yu und Nicolantonio, 1998; Voigtländer et al., 1999). Außerdem konnte für die Ratte (Voigtländer et al., 1999) und für den Menschen (Germain et al., 1999) mittels Reninpromotorkonstrukten ein inhibierender Einfluss des

Intron I auf die Reningenexpression nachgewiesen werden. Für die Ratte wurde eine komplexe Struktur bestehend aus mindestens 5 negativen und 2 positiven Elementen identifiziert, wobei ihre Bedeutung für die gewebespezifische Expression des Reningens noch aufgeklärt werden muss (Voigtländer et al., 1999).

1.5.3.2 Posttranskriptionelle Regulation

Wegen des durch cAMP vermittelten enormen Anstiegs der Renin mRNA Konzentration wird vermutet, dass eine transkriptionelle Regulation alleine nicht ausreicht um diese hohen Renin mRNA Konzentration zu erreichen. Deshalb war es auch nicht überraschend als gefunden wurde, dass cAMP in Calu-6 Zellen und JG-Zellen die Renin mRNA Halbwertszeit verdreifachen kann (Lang et al., 1996; Chen et al., 1993; Sinn et al., 1999). Die Stabilisierung der mRNA von verschiedenen Genen durch cAMP wurde bereits mehrfach beschrieben, jedoch wurde bis jetzt weder eine allen Genen gemeinsame Zielsequenz noch ein gemeinsamer Mechanismus charakterisiert (Tillmann-Bogush et al., 1999).

1.6 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einem, den am cAMP- vermittelten Anstieg der Renin mRNA beteiligten Signaltransduktionsweg zu charakterisieren. Dabei sollte geklärt werden, inwieweit die Renin mRNA durch cAMP stabilisiert wird und ob die Transkription des Reningens durch einen sogenannten CRE (cAMP responsive element)- Element erhöht wird.

Des weiteren sollte geklärt werden, inwieweit Aldosteron, als Mitglied des RAAS, neben dem indirekten Einfluss auf die Reninsekretion und Reninsynthese über die Regulation des Salzgehalts auch einen direkten Effekt auf die Reninsynthese bzw. Reninsekretion ausübt. Im Speziellen sollte dabei eine mögliche Interaktion mit dem cAMP Signalübertragungsweg näher charakterisiert werden.

Ferner sollte untersucht werden, ob der Transforming growth factor beta I (TGF- β I) und Transforming growth factor II (TGF- β II) einen Einfluss auf die Reninsekretion bzw. Reninsynthese hat. Funktionelle Daten aus der TGF- β II knockout Maus (Pietri et al., 2002) und immunhistologische Daten, die eine Co-Expression von TGF- β Rezeptoren mit den JG- Zellen zeigen, (Liu und Ballermann, 1998) legen diese Vermutung nahe.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
PSP73	Expressionsvektor mit SP6 und T7 RNA Polymerasebindestelle	Promega
pSP73/ actin	PSP73 Vektor mit 273bp-Fragment des murinen Aktin Gens; Sonde für Protection Assay	Wagner et al. 1997
pSP73/ renin	PSP73 Vektor mit 194bp-Fragment des murinen Renin 1C Gens; Sonde für Protection Assay	Wagner et al. 1997
pGL3- Enhancer	Luziferaseexpressionsvektor mit SV40 Enhancerelement und Neomycin/ Ampicillin Resistenzgenen	Promega
pTk	Renillaexpressionsvektor mit Thimidinkinasepromotor und und Neomycin/ Ampicillin Resistenzgenen	Promega
p43	pGL3- Enhancer mit 4,2 kb Fragment des Renin 1C Promotors	Müller et al., 2002
p45	pGL3- Enhancer mit 2,8 kb Fragment des Renin 1C Promotors	Müller et al., 2002
p45 M2797	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -2797	diese Arbeit
p45 M2682	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -2682	diese Arbeit
p45 M2576	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -2576	diese Arbeit
p45 M2188	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -2188	diese Arbeit
p45 M1523	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -1523	diese Arbeit
p45 M1092	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -1092	diese Arbeit
p45 M536	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -536	diese Arbeit
p45 M136	wie p45, jedoch mit SacII Restriktionsschnittstelle bei -536	diese Arbeit
p45 Δ 2866-2576	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von -2866 bis -2576 des Reninpromotors	diese Arbeit
p45 Δ 2866-2797	wie p45, jedoch mit einer Deletion der	diese Arbeit

	Basenpaare von –2866 bis –2797 des Reninpromotors	
45 Δ2866-2682	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –2866 bis –2682 des Reninpromotors	diese Arbeit
45 Δ2682-2576	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –2682 bis –2576 des Reninpromotors	diese Arbeit
45 Δ2576-2188	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –2576 bis –2186 des Reninpromotors	diese Arbeit
45 Δ2188-1523	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –2188 bis –1523 des Reninpromotors	diese Arbeit
45 Δ1523-1092	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –1523 bis –2576 des Reninpromotors	diese Arbeit
45 Δ1092-536	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –1092 bis –536 des Reninpromotors	diese Arbeit
45 Δ536-136	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –536 bis –136 des Reninpromotors	diese Arbeit
45 Δ2698-2695	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –2698 bis –2695 des Reninpromotors (CRE-consensus Sequenz)	diese Arbeit
45 Δ2674-2671	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –2674 bis –2671 des Reninpromotors (CRE-consensus Sequenz)	diese Arbeit
45 Δ2657-2654	wie p45, jedoch mit einer Deletion der Basenpaare von –2657 bis –2654 des Reninpromotors (CRE-consensus Sequenz)	diese Arbeit

2.1.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
Klar 42	5'ggatccgtccattgagcagcatga'3	PCR Mineralokortikoid sense
Klar 43	5'gaattctggaaacggagcaccttg'3	PCR Mineralokortikoid antisense
Klar 58	5'atgaagggggtgtctgtggggtc'3	PCR Renin sense
Klar 59	5'atgcggggagggtgggcacctg'3	PCR Renin antisense
Klar 65	5'caggaaatgctgaagccgcggaggcttagtt cctgcctg'3	Mutageneseprimer mit Klar 66
Klar 66	5'caggcaggaactaaagcctccgcggcttcag catttctg'3	Mutageneseprimer mit Klar 65
Klar 67	5'ccatgcgtggtggcacgtgccgcggattcct gacttggg'3	Mutageneseprimer mit Klar 68
Klar 68	5'cccaagtcaggaatccgcggcacgtgccac cacgcatgg'3	Mutageneseprimer mit Klar 67
Klar 69	5'ctgagccaggactgcccgcggggtccattca gctgtttc'3	Mutageneseprimer mit Klar 70
Klar 70	5'gaaacagctgaatggaccccgccggcagtc ctggtcag'3	Mutageneseprimer mit Klar 69
Klar 71	5'gccagtaggaggggtccgcgggaagcca gctgcgcttg'3	Mutageneseprimer mit Klar 72
Klar 72	5'caagcgagctggcttcccgcggacccctc ctactggc'3	Mutageneseprimer mit Klar 71
Klar 73	5'ggccttggtgggcacctgccgcggggaata aaggaggtg'3	Mutageneseprimer mit Klar 74

Klar 74	5'cacctcctttatttccccgcggcaggtgccaa caagcc'3	Mutageneseprimer mit Klar 73
Klar 85	5'ggatccctgtgagacagatggtc'3	PCR TGF- β II Rezeptor sense
Klar 86	5'gaattcgagactggaccagcaatg'3	PCR TGF- β II Rezeptor antisense
Klar 87	5'ggatccctggagacggtttgccac'3	PCR TGF- β I Rezeptor sense
Klar 88	5'gaattccagcagctccgtgttg'3	PCR TGF- β I Rezeptor antisense
Klar 95	5'tgcagacttccccaccgcggtccttctgta cct'3	Mutageneseprimer mit Klar 96
Klar 96	5'aggattacagaaggaccgcggtggggga tctgca'3	Mutageneseprimer mit Klar 95
Klar 125	5'acgcagatggtgacctggctgtactct'3	Gelshiftassay mit Klar 126
Klar 126	5'agagtacagccaggtcaccatctgcgt'3	Gelshiftassay mit Klar 125
Klar 127	5'atcctcccaatgacatcactaaccacg'3	Gelshiftassay mit Klar 128
Klar 128	5'cgtggtagtgatgtcattgggaggat'3	Gelshiftassay mit Klar 127
Klar 129	5'ggctgtactctgacctctgagtggctg'3	Gelshiftassay mit Klar 130
Klar 130	5'cagccactcagaggtcagagtacagcc'3	Gelshiftassay mit Klar 129
Klar 134	5'agagattgcctgacgtcagagagctag'3	Gelshiftassay mit Klar 135
Klar 135	5'ctagctctctgacgtcaggcaatctct'3	Gelshiftassay mit Klar 134

2.1.3 Internetdienste und Software

The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Webcutter II: <http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.html>

Nebcutter V1.0: <http://tools.neb.com/NEBcutter/index.php3>

MatInspector/TRANSFAC: <http://www.gsf.de/bio.dv/matinspector.html>

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

LB-/LB _{amp} - Medium:	10g NaCl 10g Bacto-Trypton 5g Yeastextract für LB _{amp} -Medium zusätzlich 100µg/ml Ampicillin
LB-/LB _{amp} - Agarplatten:	10g NaCl 10g Bacto-Trypton 5g Yeastextract 20g Agar für LB _{amp} -Platten zusätzlich 100µg/ml Ampicillin
Zellkulturmedium: (DMEM)	500ml Dulbecco's modified Eagle Medium 5ml Pen/ Strep Lösung (1000 U Penicillin, 10mg/ml Streptomycin) 25ml fetales Kälberserum 5ml 100mM Na-Pyruvat 2,5ml 200mM L-Glutamin
10xTBE	108g Tris, 55g Borsäure, 40ml 0,5M Na ₂ EDTA (pH8.0) add 1l H ₂ O
10xPBS	80g NaCl; 2g KCl, 26,8g Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O, 2,4g KH ₂ PO ₄ gelöst in 1l H ₂ O, pH7,4
10x TBS	50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5
TBS/T	1x TBS mit 0,1% Tween 20
Blockierungslösung	TBS/T mit 5% Milchpulver
Lösung D:	250g Guanidinium Thiocyanat 4M 293ml H ₂ O 125 ml 0,1M Na-Citrat 26,4ml 10% Sarcosyl vor Gebrauch zusätzlich 260µl 2-Mercaptoethanol pro 50ml Lösung
Wassergesättigtes Phenol:	1kg Phenol bei ca. 60 ⁰ C schmelzen 1,5l DEPC-H ₂ O 0,1% Hydroxychinolin aufgießen, schütteln, Phasen trennen lassen
2M Natriumacetat pH 4	41,02g Natriumacetat 120ml Eisessig (pH 4 einstellen) add 250ml DEPC-H ₂ O

Hybridisierungspuffer	40mM PIPES 400mM NaCl 80% Formamid 5mM Na-EDTA add 40ml DEPC-H ₂ O
RNase-Puffer	10mM Tris/HCl (pH 7.5) 5mM EDTA 300mM NaCl
RNase Stammlösung	4mg/ml RNase A 200µg/ml RNase T1 in 4ml RNase Puffer
Proteinase K Stammlösung	1mg/ml Proteinase K in RNase-Puffer lösen und vor Gebrauch 200µl einer 20% SDS Lösung zugeben
DEPC-H ₂ O und	1ml DEPC zu 1l H ₂ O zugeben, kräftig schütteln ü.N. stehen lassen; am nächsten Tag autoklavieren
8% Acrylamidgel	Rotiphorese Sequenziergelsystem 320ml Konzentrat 580ml Verdünner 100ml Puffer
Zellkernextraktionspuffer A	10mM Tris-HCl pH7,5; 60mM KCl; 1mM Na ₂ EDTA
Zellkernextraktionspuffer B	10mM Tris-HCl pH7,5; 60mM KCl; 1mM Na ₂ EDTA; 0,4% Nonidet P40
Zellkernextraktionspuffer C	20mM Tris- HCl pH7,5; 0,4M NaCl; 1,5mM MgCl ₂ ; 25% Glycerin
4% Acrylamidgel für Gelshifts	2ml 10x TBE; 2,5ml 37.5:1 PAA; 1,5ml 40% AA; 1,25ml 80% Glycerin; 30,4ml H ₂ O; 20µl TEMED; 300µl 10x APS

2.1.5 Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Adefo

Röntgen Rapid Entwickler und Fixierer

Amersham

[$\gamma^{32}\text{P}$] UTP 250 μCi , [$\gamma^{33}\text{P}$] GTP 250 μCi , [$\alpha^{33}\text{P}$] ATP 250 μCi , DNase (20000 U/ml)

Appligene oncor

Aqua Phenol

AssayDesign Inc.

cAMP-Elisa

BioRad, München

TEMED, Ammoniumpersulfat, Nitrocellulose Blotting Membranen

Biozym

SafeSeal Tips

Boehringer, Mannheim

PMSF, RNase A, Restriktions- und DNA modifizierende Enzyme

Charles River GmbH, Kißlegg

Mäuse, C57/Black 6

DiaSorin

Angiotensin I Radioimmunoassay RENCTK

Difco, Detroit (USA)

Bacto Pepton, Hefeextrakt, Bacto Agar

Gibco, Eggenstein

DMEM- Medium

Invitrogen

TOPO-pCRII Cloning Kit, TOPO-pCR2.1 Cloning Kit

Kodak, Rochester (USA)

Biomax MR-Filme

MBI- Fermentas, St. Leon

Restriktionsenzyme mit Restriktionspuffer, X-Gal

Merck

nicht alle anderweitig aufgeführten Chemikalien

MWG-Biotech, Ebersberg

Synthese von Oligonukleotiden

Pharmacia, Madison (USA)

Restriktionsenzyme, T4-DNA Ligase

Pierce, Rockford (USA)

ECL Entwicklerlösung

Promega, Madison (USA)

Miniprep DNA Purification System, pGEM T_{easy} Vector System, pGL3- Enhancer, Vektor, pGL3-Basic Vektor, pTK- Vektor, competent E.coli JM109, Dual Luciferase Reporter Assay Kit

Renner, Dannstadt-Schaudernheim

Sterilfilter

Roche

Lightcycler Kapillare, Lightcycler Kit

Roth Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung, Glycerin, Rotiphenol(H₂O,TE), Scintillationsflüssigkeit ratszint eco plus

Santa-Cruz

Antikörper: anti-mouse TGF- β I, anti-mouse TGF- β II,

Sarstedt

5ml, 10ml und 25ml Auslaufpipetten, 25cm² und 75cm² Zellkulturflaschen

Schleicher und Schuell, Dassel

Whatman-Papier

Schott

Glaswaren

Serva, Heidelberg

Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sigma, Deisenhofen

Agarose, Aminosäuren, Ampicillin, DMSO, PMSF, Ponceau S, Tween 20, Triton X-100, Xylencyanol

QIAGEN

Plasmid Maxi (25) Kit

2.1.6 Geräte

Analysenwaage	Mettler, H-20T
Autoklav	KSG 112
Elektrophoreseapparatur	Life Technologies Inc., Mod S2
	Pharmacia, LKB 2050 MIDGET
Geltrockner	BIO-RAD, Model 583 gel-dryer
	Vacuum Slab gel-dryer
Heißluftschüttler	New Brunswick Scientific, Innova 4000
Inkubationsschrank	Heraeus, Modell B6200
	IG 150 Jouan
Instant Imager	Packard, Electronic Autoradiographie
Kühl- und Gefrierschränke	AEG, Santo Kühlschrank
	Siemens, Comfort plus Gefrierschrank
	New Brunswick Scientific, Ultra-low-freezer-85°C
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001
Mikroskop	Zeiss, IG 03
Ölpumpe	Edwards, High Vacuum Pump Typ B5/2208
PCR Geräte	MWG, Mod. Omnigene Thermocycler
	Perkin Elmer, DNA Thermo Cycler 480
	Roche, Lightcycler
pH-Meter	Knick, Digital pH-Meter
Pipetten	Gilson, Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000
Spannungsquellen	Pharmacia, LKB ECPS 3000/150
	Pharmacia, LKB GPS 200/400
	Pharmacia, Multidirve XL
Sterilbank	Jouan, IC 2.12
Szintillationszähler	Packard, Tri- Carb 1500
UV-Spektrometer	Pharmacia, Gene Quant II
UV- Leuchttisch	Renner, Fluorescent Tables
Vortexgeräte	Schientific Industries, Vortex Genie 2
Waage	Mettler, P-1210 Feinwaage
Wärmeblock	Eppendorf, Thermostat 5320
	Eppendorf, Thermomixer 5436
Zentrifugen	Heraeus Varifuge 20RS
	Heraeus Megafuge 1.0
	Eppendorf Centrifuge 5417R

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Organismen und eukariontischen Zellkulturen

2.2.1.1 Anzucht von *E. coli* Bakterien

Die Kultivierung der *E.coli* Bakterien wurden bei 37⁰C in LB-Medium durchgeführt. Bei Plasmid tragenden *E.coli* Stämmen wurden zusätzlich 100µg/ml Ampicillin zugesetzt. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden 400µl einer *E.coli* Suspension mit 15% Glycerin versetzt und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei –80⁰C.

2.2.1.2 Anzucht und Kultivierung der As4.1 Zellen

Die mit dem SV40 Antigen immortalisierte murine juxtaglomeruläre Zelllinie As4.1 wurde von der amerikanischen Type Culture Collection (ATCC No. CRL 2193) bezogen (Sigmund et al., 1990). Die Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte in 25cm² bzw 75cm² großen Zellkulturflaschen mit Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 5% FCS, 2,5 ml 200 mM L-Glutamin, 2.5 ml 100 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin bei 37⁰C und 10% CO₂. Das Medium wurde alle 48h gewechselt. Bei 90% Konfluenz wurden die Zellen mit einer 0,25% Trypsin / 0,02% EDTA abgelöst und in 1:5 verdünntem neuem Medium in neue Kulturflaschen ausgesät. Die Versuche wurden ebenfalls bei 90% Konfluenz der Zellen gestartet, wobei das Kulturmedium gegen ein neues Kulturmedium mit Zusatz der jeweiligen Testsubstanzen ersetzt wurde. Dauerkulturen wurden angelegt indem abgelöste Zellen in Kulturmedium mit 8% DMSO aufgenommen und anschliessend langsam (1⁰C/min) in einer Cyrobox auf –80⁰C abgekühlt wurden. Die Aufbewahrung erfolgte in flüssigen Stickstoff.

2.2.1.3 Isolation und Kultivierung von nativen juxtaglomerulären Zellen

Zur Isolation der juxtaglomerulären Zellen werden zwei Mäusen (C57/ Bl 6) durch Genickbruch getötet und die Nieren antiseptisch entnommen. Nach der Entnahme wurden die Nieren in steriler Lösung 1 gewaschen, anschliessend die Nierenkapsel

entfernt und die Niere mit einem sterilem Skalpell grob zerkeinert. Die Nierenstücke wurden für weitere 60 - 90 min in 35 ml Verdauungslösung (Lösung 1 mit 53 mg Trypsin und 75 mg Collagenase) bei 37°C unter ständigem Rühren inkubiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde durch einen 22µm Nylon-Filter gefiltert, der Durchfluß zweimal in Lösung 1 gewaschen und die pelletierten Zellen in 4 ml Lösung 1 resuspendiert. Die gereinigte Zellsuspension wurde mit 56 ml 30% isoosmotischer Percoll-Lösung gemischt, auf zwei Sorvall-Zentrifugiergefäße verteilt und bei 27000g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Von den nach der Zentrifugation typischen 4 Banden akkumulierter Zellen wurde die dritte von oben mit einer Dichte von 1,07 g/ml abgesaugt und die Zellen erneut in Lösung 1 gewaschen. Das Zellpellet wurde in 3.6 ml Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 5% FCS, 2,5 ml 200 mM L-Glutamin, 2.5 ml 100 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin aufgenommen und bei 37°C und 5% CO₂ zu je 100µl Aliquots je 96er Well kultiviert. Nach 24h wurden die Zellen mit Medium gewaschen und anschliessend mit Medium unter Zusatz der Teststimulanzen kultiviert.

2.2.2 Gentechnische Methoden

Standardmethoden (Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese, Dephosphorylierung, Klenow- und T4-DNA Polymerasereaktion, Ligation, Transformation von *E.coli*) wurden wie in Sambrook *et al.* beschrieben durchgeführt. Kompetente *E.coli*s wurden von der Firma Promega bezogen.

2.2.2.1 Elution von DNA aus Agarosegelen

Für die präoperative Gelelektrophorese mit anschliessender Isolation der DNA aus dem Gel wurden einprozentige Agarosegele verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte standardmäßig mit dem Gel Extraction Kit von Roche. Die gereinigte DNA wurde in 30µl H₂O aufgenommen.

2.2.2.2 Plasmidpräparation aus E. coli

Die Gewinnung von Plasmiden aus E.colis wurde entweder im kleinen Maßstab (aus 2ml LB-Kultur, Miniprep) oder im größeren Maßstab (aus 100ml LB-Kultur, Maxiprep) mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits laut des beiliegenden Protokolls durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der so gewonnenen Plasmid-DNA wurde photometrisch bei 260nm vermessen.

2.2.2.3 Isolation von genomischer DNA aus eukariontischen Zellen

Zur Isolation von genomischer DNA wurden die As4.1 Zellen in einer 75cm² Kulturflasche bis zu 90% Konfluenz angezogen. Zum Ernten der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und anschließend die Zellen mittels eines Zellschabers abgekratzt. Die weitere Isolation erfolgte standardmäßig mit QIAGEN genomic DNA extraction Kit.

2.2.2.4 DNA-Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurde von der Firma SequiServe in Vaterstetten durchgeführt.

2.2.2.5 Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolation der RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte leicht abgewandelt nach dem Guanidinium-Phenol-Chloroform Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Für die RNA-Isolation wurden grundsätzlich nur als RNase-frei gekennzeichnete Plastikwaren verwendet. Glaswaren wurden durch dreistündiges Erhitzen auf 180⁰C RNase-frei gemacht, zweifach destilliertes H₂O wurde vor der Verwendung mit DEPC behandelt. Die Zellen wurden in 25cm² Flaschen angezogen und für 24h mit der Testsubstanz inkubiert. Zur RNA- Isolation wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zelllyse durch Zusatz von 500µL Lösung D⁺ durchgeführt. Das Zelllysate wurde mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgekratzt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 50µl Na-Acetat pH5.2 3M, 500µl Phenol pH4 und 100µl Chloroform zugegeben und der gesamte Ansatz kräftig für mindestens 20sec gevortext. Nach einer 15min Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation bei 10000g für 15min bei 4⁰C in einer Eppendorftischzentrifuge erfolgte

eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase (ca. 500µl) wurde abgenommen und in neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 500µl 100% Isopropanol p.A. gemischt. Die RNA wurde durch Inkubation für mindestens 1h bei -20°C und anschliessender Zentrifugation bei 15000g für 30min bei 4°C in einer Eppendorftischzentrifuge gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 250µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurde das Pellet für 30min bei RT getrocknet und danach in 100µl H₂O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260nm bestimmt.

2.2.2.6 Einzelstrang cDNA Synthese

Für die Reverse Transkriptasereaktion wurden 3µg total RNA mit 0,5µg/µl Oligo d(T₁₂₋₁₈) Nukleotiden gemischt, für 5min auf 65°C erhitzt und anschliessend sofort auf Eis gestellt. Zu dem Reaktionsgemisch (20µl) wurden zusätzlich 100 Units M-MLV Reverse Transkriptase, 0,5µl RNasin, 10mM dNTPs und 4µl first strand Puffer zugegeben. Die cDNA Synthese erfolgte bei 37°C für 1h. Für die anschliessende Polymerasekettenreaktion wurden je 2µl der Reversen Transkriptionsreaktion verwendet.

2.2.2.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde standardmäßig und falls nichts anderes angeben in einem 20µl Ansatz mit 1µl Taq (Roche), 2µl 10x PCR-Puffer, 2µl dNTPs (je 2.5mM), 2µl cDNA und je 1µl des 5' und des 3' Primers (je 10pmol) durchgeführt. Das Protokoll bestand aus 32 Zyklen mit 30 sec Denaturierungsphase bei 94°C, 30 sec Annealingphase bei 60°C und 1min Elongationsphase bei 72°C. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde der PCR- Ansatz für weitere 10min bei 72°C inkubiert. Die PCR- Produkte wurden auf 2% Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen analysiert.

2.2.2.8 In vitro Transkription

Bei der in vitro Transkription wurde mit Hilfe der SP6 Polymerase (eine DNA abhängige RNA Polymerase) eine mit [α^{32} p] GTP oder [α^{33} p] UTP markierte cRNA erzeugt.

Die Markierungsreaktion erfolgte bei 37°C für 60 min wobei 0,7µl dNTPs (10pmol), 2µl Transkriptionspuffer, 0,5µl DTT (200mM), 0,8µl RNAsin, 1µl SP6 Polymerase und 5µl [α^{32} P] GTP oder [α^{33} P] UTP gemischt wurden. Als Template wurde zum Ansatz 1µg linearisiertes Plasmid (1µg/ µl) zugeben. Die Markierung wurde durch Zugabe von 1U DNase I und weiterer Inkubation für 20min bei 37°C gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde mit 89µl TE-Puffer aufgefüllt und anschliessend die markierte cRNA mittels Sephadex G50 Säulen aufgereinigt. Von der dadurch erhaltenen cRNA wurden 2µl in 5ml Szintillationsflüssigkeit geben und im β -Counter vermessen.

2.2.2.9 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Polymerasekettenreaktion wurde mit dem Light Cycler DNA Master SBYR Green I Kits von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und einem Lightcycler (Roche) durchgeführt. Alle Proben wurden in einem Reaktionsvolumen von 20µl mit 2µl des Fast Starter Master Mixes, je 1pmol sowohl des sense als auch des antisense Primers, 3mM MgCl₂ und 2µl cDNA vermessen. Das Amplifikationsprotokoll bestand aus 40 Zyklen mit einer 10sec Denaturierungsphase bei 94°C, 5sec Annealingsphase bei 60°C und einer Elongationsphase bei 72°C für 16sec. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Nach dem Durchlaufen des Amplifikationsprogramms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/ sec) von 60°C auf 94°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen.

2.2.2.10 RNase-Protection Assay

Zur Quantifizierung der Expression von bestimmten Genen wurde ein RNase-Protection Assay durchgeführt. Für das zu untersuchende Gen wurde eine Sonde erstellt, indem ein PCR-Fragment mit BamHI / EcoRI Adaptoren generiert und in die Polylinker-Site des pSP73-Vektors kloniert wurde, so dass durch eine in vitro Transkription mit einer SP6-Polymerase eine antisense cRNA entsteht. Für das Aktin Gen wurde mittels der Primer SupAct1 und SupAct2 eine 273bp und für das Renin Gen mittels der Primer KLAR58 und KLAR59 eine 194bp lange Sonde erstellt. Nach der Linearisierung des Vektors durch HindIII und anschliessender Überprüfung, erfolgte in einer in vitro Transkription die Bildung von radioaktiv [α^{33} P] GTP oder [α^{32} P]UTP

markierter cRNA. Die Hybridisierung erfolgte in 50µl Hybridisierungslösung mit 10µg Gesamt-RNA für das Renin-Gen und mit 2µg Gesamt-RNA für das Aktin-Gen pro Ansatz bei 60°C ü.N., wobei in 50µl Hybridisierungslösung 500000cpm der jeweiligen radioaktiv markierten Sonde zugesetzt wurde. Durch den anschliessenden Zusatz von RNase A/T1 für 30min bei RT wurde die nicht hybridisierte RNA und Sonde geschnitten, der nachfolgende Proteinase K Zusatz (1mg/ml) mit Inkubation für 30min bei 37°C inaktivierte die RNase A/T1. Eine anschliessende Reinigung der RNA-Hybride erfolgte durch Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol Gemisches und anschliessender Fällung der RNA-Hybride aus dem wässrigen Überstand durch Isopropanol und zusätzlich 20µg tRNA. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet nach vollständiger Trocknung an Luft in 5µl Ladepuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein 8% Polyacrylamidgel wurden die Hybride bei 94°C für 15min aufgeschmolzen. Der Gellauf erfolgte für 2.5h bei 80W. Nachdem Lauf wurde das Gel im Vacuumtrockner getrocknet und im Phosphorimager ausgewertet.

2.2.2.11 Gerichteter Basenaustausch

Die Mutagenisierung der Plasmide wurde mit Hilfe des QuickChange Site directed mutagenesis kit der Firma Stratagene durchgeführt. Dabei wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide (sh. 2.1.2) so gewählt, dass sie die zu mutierende Sequenz enthalten. In einer darauffolgenden Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die obigen Oligonukleotide mit dem zu mutierenden Plasmid- DNA eingesetzt (50µl Ansatz mit 3,5U Pwo/ Taq, 1µl je 10pmol Oligonukleotide, 3µl 2,5mM dNTPs, 50ng Plasmid-DANN; 18 Zyklen mit 94°C für 1min, 60°C für 1min und 68°C für 20min). Der PCR- Ansatz wurde anschliessend mit dem Restriktionsenzym DpnI für 1h bei 37°C inkubiert. Dadurch wird die mütterlich Plasmid- DNA zerschnitten, während die in der PCR neusynthetisierte mutagenierte DNA unberührt bleibt. Dies liegt an der Spezifität des Restriktionsenzym, welches nur methylierte DNA schneidet. Der so behandelt PCR- Ansatz wurde direkt in E.colis transformiert, das Plasmid in einer Miniprep (2.2.2.2) reisoliert und mittels eines Restriktionsverdaus analysiert.

2.2.2.12 Erstellen von Deletionskonstrukten

Für das Entfernen einer Reninpromotorsequenz wurde an das jeweilige 5'- und 3'- Ende des zu deletierenden Bereiches mit einem gerichtetem Basenpaaraustausch eine SacII-Schnittstelle generiert. Durch einen präoperativen Restriktionsverdau mit SacII und einem anschliessendem Auftrennen des Restriktionsverdaus auf einem 1% Agarosegel, wurde die zu deletierende Sequenz vom Rest-Vektor abgetrennt. Der Restvektor wurde aus dem Gel isoliert, religiert und in E.colis transformiert, woraus erneut mittels einer Miniprep das Plasmid reisoliert wurde.

2.2.2.13 Gelshift Assay

Der Gelshift Assay wurde laut Anleitung des Protokolls der Firma Promega durchgeführt. Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurde mit [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP in einer Polynukleotidkinasereaktion radioaktiv markiert. Für jede Gelshift Reaktion (10 μl) wurden 500000cpm einer markierten DNA-Probe mit 10 μg Zellkernextrakt gemischt unter Zugabe von 5% Glycerin, 1mM MgCl_2 , 0,5mM EDTA, 0,5mM DTT, 50mM NaCl, 10mM Tris (pH 7,5) und 0,05mg/ml poly(dI-dC)poly(dI-dC). Das Reaktionsgemisch wurde für 30min bei RT inkubiert und anschliessend auf 4% Polyacrylamidgel in 0,5x Tris-Borat-EDTA Puffer geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei RT für 30-45min bei 10W. Die Gele wurden getrocknet und ein Autoradiogramm wurde erstellt. Für die Supershift Assays wurden zusätzlich zum Reaktionsgemisch 1 μl des Antikörpers zugegeben.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung wurden mit einer modifizierten Methode nach Lowry et al. (1951) durchgeführt. Die Probe wurde auf 100 μl Volumen gebracht und nach Zugabe von 5ml Biorad Lowry-Lösung 5 – 60 min bei RT inkubiert. Zur Eichung des Tests wurden die Messungen mit BSA- Mengen von 1- 15 μg durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 595nm bestimmt.

2.2.3.2 Proteinextrakt aus As4.1 Zellen

Bei 90% Konfluenz der Zellen in einer 75 cm² Kulturflasche wurden das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig abgenommen und anschliessend die Zellen mittels eines Zellschabers vom Kulturschalenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in 500µl kaltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitorcocktail (Roche) aufgenommen, mit 100µl 6x SDS-Loading Buffer versetzt und sofort für zweimal 10 sec. mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach 5 min Inkubation bei 94⁰C wurde der Proteinextrakt abzentrifugiert und entweder sofort auf ein SDS- Gel geladen oder in flüssigen Stickstoff weggefroren.

2.2.3.3 Präparation von Kernextrakten

As4.1 Zellen wurden zur Gewinnung von Kernextrakten bis zu einer 90%igen Zelldichte in einer 75cm² Kulturflasche angezogen. Vor dem Abkratzen der Zellen mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Die geernteten Zellen wurden in bei 1200rpm für 5min bei 4⁰C abzentrifugiert, in 1ml Kernextraktionspuffer A aufgenommen und für weitere 5min auf Eis inkubiert. Es folgte erneutes Abzentrifugieren bei 1200rpm für 5min, das Resuspendieren der Zellen in 500µl Kernextraktionspuffer B und wiederholtes Inkubieren der Zell auf Eis für 3min. Anschliessend wurden die durch das NP-40 lysierten Zellen bei 2500rpm abzentrifugiert und die so pelettierten Zellkerne nach einem Waschschrift für 5min bei 4⁰C mit 500µl Kernextraktionspuffer A in 50µl Kernextraktionspuffer C aufgenommen und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Der Überstand wurde als cytosolisches Zelllysate bei -80⁰C aufbewahrt.

2.2.3.4 Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über 10% SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli, 1970), wobei die aufzutrennende Probe je nach Volumen mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 150V bis zum Auslaufen der blauen Farbstoffbande.

2.2.3.5 Western Blot Analyse

Zum Immunnachweis wurden Proteine nach der Auftrennung über SDS-PAGE elektrophoretisch 1,5h bei 150mA auf eine Nitrozellulosemembran überführt (Dunn, 1986) und anschliessend reversibel mit Ponceau S gefärbt. Zur Absättigung der Membran wurde diese mindestens 30min in Blockierungspuffer inkubiert. Anschliessend wurde im gleichem Puffer der primäre Antikörper entsprechend verdünnt zugeben und entweder für 2h bei RT oder bei 4°C ü.N. inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal für je 10min in 10ml PBS-Lösung gewaschen und anschliessend mit den sekundären an Peroxidase gekoppten Antikörper in entsprechender Verdünnung inkubiert. Die Detektion des gebundenen Peroxidasekonjugats erfolgte mit Hilfe des ECL Western Blot Detektions Kits (Pierce) laut Herstellerangaben.

2.2.4 cAMP Konzentrationsbestimmung

Die cAMP Konzentrationsbestimmung wurde mit dem cAMP-ELISA der Firma Assay Designs und nach deren Anleitung durchgeführt. Um den cAMP-Spiegel in As4.1 Zellen zu messen wurden 20000 Zellen pro Well in einer 96er Wellplatte ausgesät und 16 bis 24h später das Medium gegen Medium mit Zusatz der Testsubstanzen ersetzt. Native JG-Zellen aus zwei Mäusen wurden nach der Präparation in 30 Wells einer 96er Wellplatte aufgeteilt und ebenfalls nach 16 bis 24h wurde das Medium gegen Medium mit Zusatz der Testsubstanzen ersetzt. Die Inkubation erfolgte je nach Versuchsprotokoll für 1 bis 24h, anschliessend wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 100µl pro Well einer 0,1M HCl versetzt. Die lysierten Zellen wurden bei 600g für 5min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand direkt in den ELISA-Test eingesetzt.

2.2.5 Bestimmung des Reningehalts

Um die Reninexpression in As4.1 Zellen und JG- Zellen zu bestimmen wurde in einer enzymatischen Reaktion die durch Renin katalysierte Bildung von Angiotensin I aus

Angiotensinogen gemessen, wobei das gebildete Angiotensin I direkt proportional zum in der Probe enthaltenen Reningehalt ist. Die Bestimmung der Angiotensin I Konzentration wurde mit einem Radioimmunoassay der Firma Sorin Biomedica durchgeführt.

20000 As4.1 Zellen wurden pro Well in einer 96er Wellplatte ausgesät und 16 bis 24h später das Medium gegen Medium mit Zusatz der Testsubstanzen ersetzt. Native JG-Zellen aus zwei Mäusen wurden nach der Präparation in 30 Wells einer 96er Wellplatte aufgeteilt und ebenfalls nach 16 bis 24h wurde das Medium gegen Medium mit Zusatz der Testsubstanzen ersetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24h. Danach wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen in 1xPBS mit 0,1% Triton x-100 unter leichtem Schütteln bei RT für 20min lysiert. Das Zelllysate und der Zellüberstand wurde für 5min bei 10000g in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Anschliessend wurde aus den jeweiligen Überständen je 5µl Probe entnommen und mit 5µl Puffer (Sorin Biomedica), 1µl PMSF, 4µl Rattenserum (aus bilateral nephrektomierten Ratten) und 10µl Maleatpuffer versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 90min bei 37°C inkubiert und anschliessend auf Eis gestellt. Die Probe wurde in mit einem Antikörper gegen Angiotensin I beschichtetes Röhrchen überführt und mit 500µl Tracer (enthält ¹²⁵J markiertes Angiotensin I in einer definierten Konzentration) für weitere 3 bis 24h bei RT inkubiert. Der wässrige Überstand wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgenommen und die im Röhrchen verbliebene Radioaktivität im γ-Zähler bestimmt. Aus der Radioaktivität konnte anhand definierter Standardproben auf das gebildete Angiotensin I rückgeschlossen und somit auch der Reningehalt im Zelllysate und im Zellüberstand bestimmt werden.

2.2.6 Isoliert perfundierte Niere

Messung an der isolierten perfundierten Niere wurden nach dem Protokoll von Holger Scholz und Armin Kurtz durchgeführt (1994). Die Perfusion der Niere von männlichen Sprague-Dawley Ratten (280- 330g) wurde in einem rezirkulierenden System durchgeführt. Die Tiere wurden mit 100 mg/ kg 5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbituratsäure (TRAPANAL^R, Byk Gulden, Konstanz) anästhesiert. Nach dem

Öffnen der Bauchhöhle wurde die rechte Niere freipräpariert und in eine temperaturregulierte Metallkammer gelegt. Anschliessend wurde intravenös Heparin injiziert (2U/ g) und die Aorta distal zur rechten Nierenarterie so abgeklemmt, dass die Durchblutung der rechten Niere während der folgendend Einführung der Perfusionskanüle distal zur Klemme nicht beeinträchtigt wurde. Nach der Ligation der großen Gefäße, welche abdominal von der Aorta abzweigen, wurde eine zweigefäßige Perfusionskanüle in die abdominale Aorta eingeführt und nahe der Klemme, distal zum Ursprung der rechten Nierenarterie, plziert. Nach der Ligation der Aorta proximal zur rechten Nierenarterie wurde die Aortenklemme schnell entfernt und die Perfusion wurde mit einer anfänglichen Flussrate von 8 ml/ min gestartet. Die rechte Niere wurde daraufhin herausgeschnitten und die Perfusion auf konstantem Druck (100mmHg) eingestellt. Der innere Nierenarteriendruck wurde über den inneren Teil der Perfusionskanüle gemessen (Startham Transducer P 10 EZ) und als rückkoppelendes Signal für die Schlauchradpumpe genutzt. Der Perfusionskreislauf wurde über eine Ableitung des venösen Ausflusses in das Reservoir (200- 220 ml) geschlossen. Der renale Fluss und der Perfusionsdruck wurden ständig aufgezeichnet. Die zu testenden Substanzen wurden in frischen Perfusat gelöst und über den arteriellen Zugang zugegeben.

Für die Bestimmung der Reninaktivität des Perfusats wurden alle 5 min Aliquots (0,1 ml) arteriell und venös entnommen. Die Reninsekretionsrate wurde aus dem Quotienten aus arterieller zu venöser Reninaktivität und dem Perfusionsfluss berechnet (ml/ min).

2.2.7 Statistik

Als statistische Größe wurden die arithmetischen Mittelwerte, deren Standardabweichung (SD) und die statische Schwankung der Mittelwerte (SEM) verwendet. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANVOVA) wurde für interindividuelle Vergleiche und der zweiseitige student's t-test für intraindividuelle Vergleiche verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkungsweise des cAMP auf die Reningenexpression

3.1.1 cAMP Konzentration in As4.1 Zellen

Nachdem aus in situ Versuchen mit isoliert perfundierten Nieren deutliche Hinweise dafür erhalten wurden, das cAMP spaltende Phosphodiesterasen (PDE) eine wichtige Rolle für die Regulation der c-AMP Konzentration in renalen juxtaglomerulären Zellen spielen (Kurtz et al., 1998), wurde zuerst die Bedeutung der PDE Aktivität auf die cAMP Konzentration in As4.1 Zellen untersucht. Der erste deutliche Hinweis auf eine beträchtliche PDE- Aktivität in As4.1 Zellen ergab sich bereits aus der Beobachtung, dass Forskolin (5 μ M), ein bekannter und starker direkter Stimulator der Adenylatzyklase die cAMP Konzentration in As4.1 Zellen nur etwa siebenfach erhöhte. Hemmung der Phosphodiesterasen durch den nichtselektiven PDE-Hemmstoff 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, 100 μ M) lies die cAMP Konzentration in As4.1 Zellen etwa um den Faktor 5 über den Basalwert ansteigen. Wenn jedoch die Adenylatzyklase durch Forskolin stimuliert und gleichzeitig die PDEs durch IBMX gehemmt wurden, dann stieg die intrazelluläre cAMP Konzentration um den Faktor 500 an (Abbildung 3.1)

Um weitere Informationen darüber zu erhalten, welche Isoform der Phosphodiesterasen für die augenscheinlich hohe Phosphodiesteraseaktivität verantwortlich ist, wurde die cAMP Konzentration in As4.1 Zellen bestimmt, bei denen die Behandlung mit 5 μ M Forskolin mit Isoform-selektiven PDE-Hemmstoffen kombiniert wurde. Für eine selektive Hemmung der Phosphodiesterasen wurde für die PDE-1 100 μ M 8-methoxymethyl-IBMX (8-MM-IBMX), für die PDE-2 2 μ M erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin (EHNa), für die PDE-3 100 μ M Milrinon, für die PDE-4 100 μ M Rolipram und für die PDE-5 100 μ M Zaprinast verwendet. Für alle weiteren bekannten Phosphodiesterasen Isoformen waren keine selektiven Hemmstoffe verfügbar. Eine Hemmung der Phosphodiesterasen mit spezifischen Blockern führte nur bei Milrinon und Rolipram bei gleichzeitiger Aktivierung der Adenylatzyklase zu einem Anstieg des intrazellulären cAMPs (200fach bei Hemmung der PDE-3 durch Milrinon und 500fach

bei Hemmung der PDE-4 durch Rolipram), während eine Hemmung der PDE-1, PDE-2 oder PDE-5 bei ebenfalls gleichzeitiger Aktivierung der Adenylatzyklase zu keinem weiteren Anstieg der cAMP Konzentration in As4.1 Zellen führte.

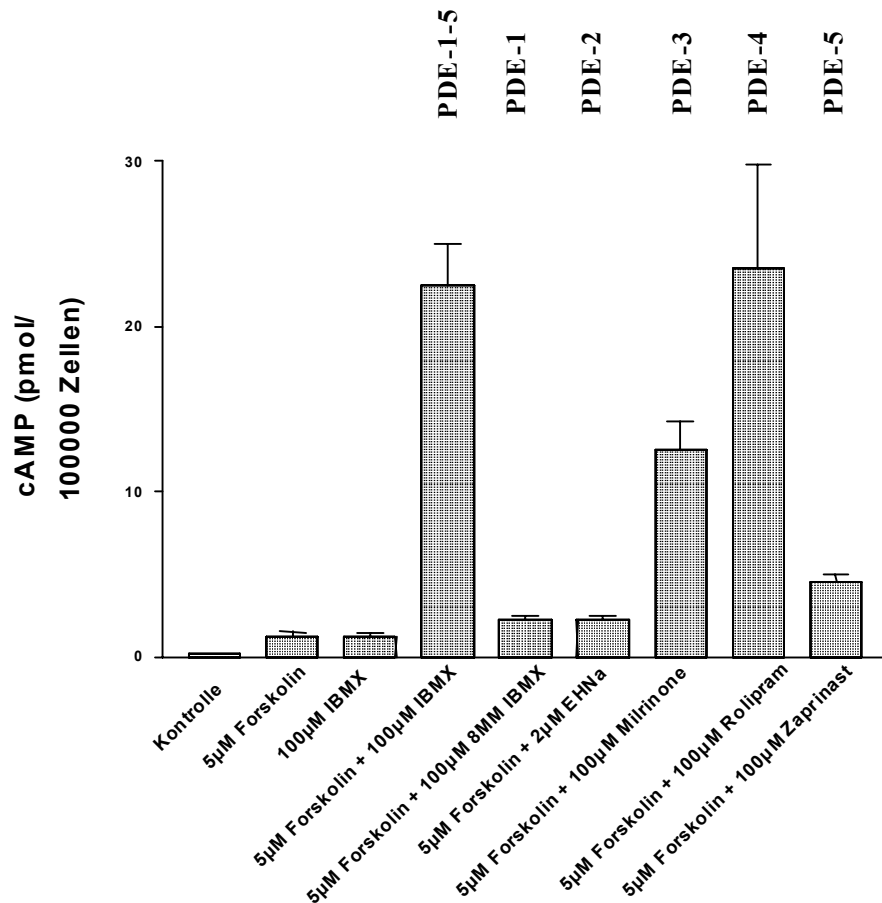


Abbildung 3.1: cAMP Konzentration in As4.1 Zellen, die mit einer Kombination von 5µM Forskolin und einem selektiven Phosphodiesterasehemmer (100µM IBMX, 100µM 8-MM-IBMX, 2µM EHNa, 100µM Milrinon, 100µM Rolipram, 100µM Zaprinast) für 24h inkubiert wurden. Die dem Phosphodiesterasehemmer entsprechende Phosphodiesterase ist am oberen Rand der Graphik erwähnt. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei unterschiedlichen Messreihen.

Komplementär zu den Ergebnissen mit den Phosphodiesterasehemmstoffe konnte ich mittels RT-PCR eine hohe Abundanz der mRNAs für die PDE-3 Isoformen PDE-3A und PDE-3B, wie auch für die PDE-4 Isoformen PDE-4B und PDE-4D in den As4.1 Zellen finden, was gut mit der Pharmakologie übereinstimmte.

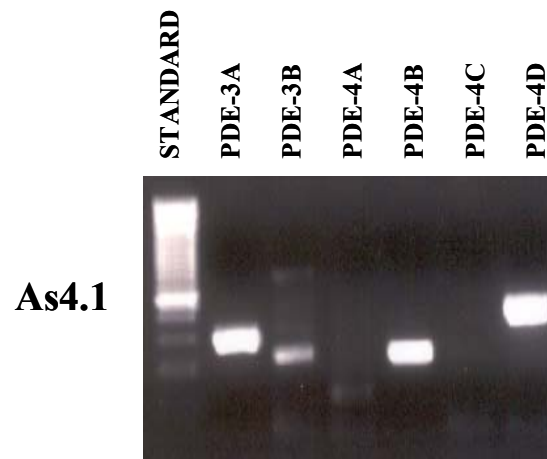


Abbildung 3.2: Ethiumbromid gefärbtes Agarosegel mit PCR-Produkten für die Isoformen der Phosphodiesterasen 3 und 4 in As4.1 Zellen.

3.1.2 Renin mRNA Konzentration und Prorenin- Sekretion

Um die mRNA Konzentration in As4.1 Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen mit 5 μ M Forskolin und 100 μ M IBMX und der Kombination aus beiden stimuliert, anschliessend die RNA isoliert und die Renin und Aktin mRNA mittels eines RNase Protektionassays quantifiziert. In Übereinstimmung mit Befunden von Jensen et al. (1998) und Laframboise et al. (1997) wurde auch hier beobachtet, dass eine Stimulation der Adenylatzyklase durch Forskolin allein zu keiner signifikanten Änderung der Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen führt. Genauso wie die alleinige Stimulation der Adenylatzyklase führt auch eine alleinige Hemmung der Phosphodiesterasen durch IBMX zu keinem signifikanten Anstieg der Reningenexpression. Nach einer Kombination aus Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin und gleichzeitiger

Hemmung der Phosphodiesterasen durch IBMX wurde eine Erhöhung der Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen zeitabhängig um den Faktor 3 beobachtet. 4 Stunden nach Beginn der Stimulation stieg die Reningenexpression kontinuierlich an und erreichte nach ungefähr 24h ein Plateau.

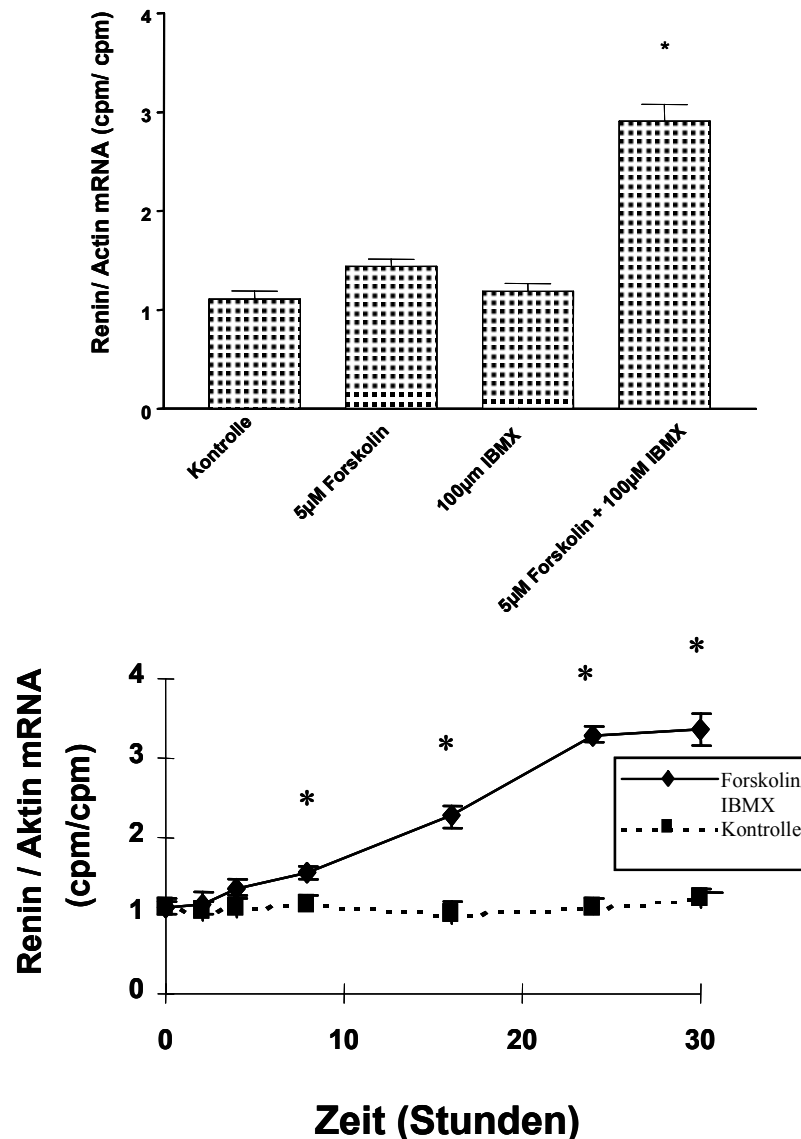


Abbildung 3.3 oben Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen, welche für 24h mit 5µM Forskolin, 100mM IBMX und der Kombination aus beiden behandelt wurden.

Unten: Zeitverlauf des Anstiegs der Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen, die für verschiedene Zeiten (0, 2, 4, 8, 12, 24, 30h) mit 5µM Forskolin/ 100µM IBMX inkubiert wurden. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Als Maß für die Reninproteinsynthese wurde parallel zur Renin mRNA Konzentration die Proreninsekretion bei Aktivierung der Adenylatzyklase und gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterasen gemessen. Dazu wurde das von den Zellen sezernierte inaktive Prorenin durch eine Trypsinbehandlung (30min, 0,5 mg/ ml, 37°C) in aktives Renin überführt. Die Quantifizierung der Reninaktivität erfolgte mittels eines Angiotensin I RIAs. Dabei wird die durch Renin katalysierte Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen bestimmt. Die Menge an generiertem Angiotensin I ist dabei nur von der Menge an in der Probe enthaltenen Renin abhängig. Die Aktivität des Renins stieg dabei ebenfalls unter Forskolin/ IBMX Stimulation nach 24h etwa 2,5fach gegenüber der Kontrolle an. Diese Aktivitätserhöhung läßt auf eine gesteigerte Reninproteinkonzentration schließen.

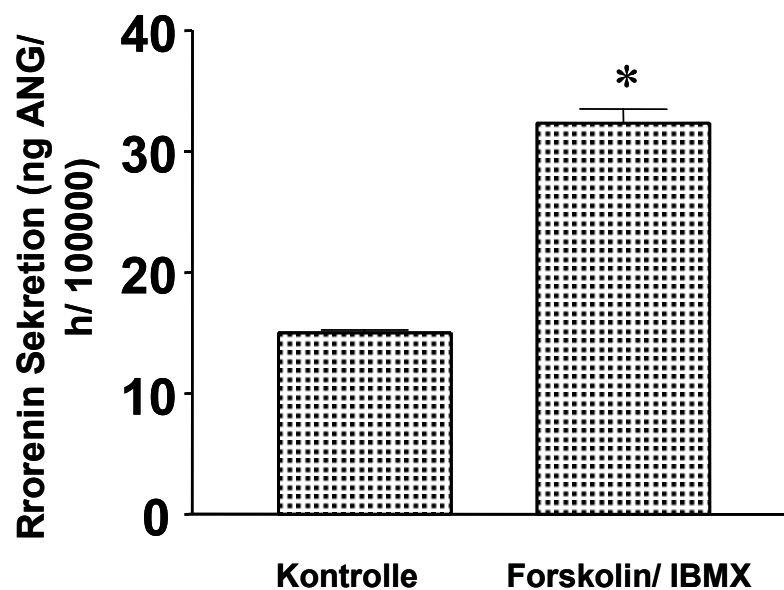


Abbildung 3.4: Prorenin Sekretion in As4.1, welche mit oder ohne 5µM Forskolin/ 100µM IBMX für 24h inkubiert wurden. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von sechs Messungen. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede mit Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

3.1.3 Proteinkinase A

Um eine nähere Charakterisierung des cAMP- Signalübertragungsweges in As4.1 Zellen durchzuführen wurde die Beteiligung der Proteinkinase A überprüft. Für die Proteinkinase A (PKA) ist seit langem bekannt, dass sie häufig am cAMP- vermittelten Signalübertragungsweg beteiligt ist.

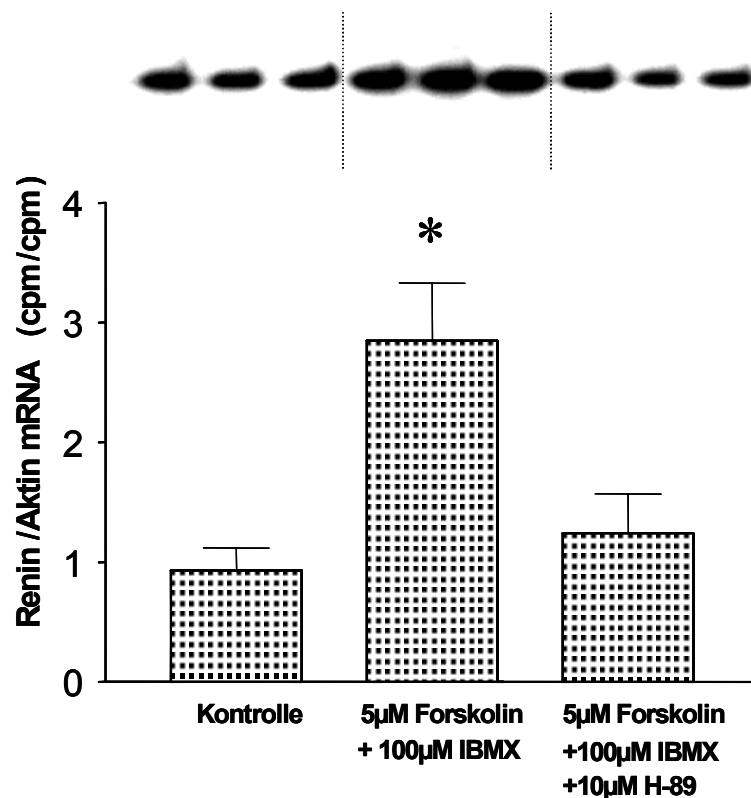


Abbildung 3.5: Einfluss von 5µM Forskolin/ 100µM IBMX in der Gegenwart und in der Abwesenheit des Proteinkinase A Inhibitors H-89 (10µM) auf die Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen. Am oberen Rand der Abbildung ist eine dazugehörige Autoradiographie eines RNA- Protectionassays zu sehen. Die Daten geben das Verhältnis des Hybridisierungssignals der Renin mRNA zur β -Aktin mRNA wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Es wurde untersucht, ob sich die durch Forskolin/ IBMX induzierte dreifache Erhöhung der Reningenexpression durch Hemmung der Proteinkinase A Aktivität modulierbar ist. Als Hemmer der PKA wurden 10 μ M H-89 verwendet. Wie aus Abbildung 3.5 ersichtlich, schwächt der PKA-Inhibitor H-89 die durch die Kombination aus Forskolin und IBMX induzierte gesteigerte Reningenexpression ab. Bei einer Kombination des PKA- Hemmers mit Forskolin/ IBMX zeigte die Renin mRNA Konzentration einen der Kontrolle vergleichbaren Wert.

3.1.4 Renin mRNA Stabilität

Der durch cAMP induzierte Anstieg der Renin mRNA Abundanz könnte entweder auf eine gesteigerte Reningentranskription oder auf eine Stabilisierung der Renin mRNA zurückzuführen sein. Um einen möglichen Effekt von cAMP auf die Stabilität der Renin mRNA zu bestimmen, wurde die Renin mRNA Halbwertszeit in Forskolin/ IBMX behandelten und unbehandelten Zellen gemessen. Dazu wurden die Zellen für 16h entweder mit oder ohne (Kontrolle) Forskolin/ IBMX inkubiert. Anschliessend wurde die zelluläre Transkription der mRNA in den Zellen mittels 2 μ M Actinomycin D gehemmt. Mit einem RNase Protektionassays wurde die Renin mRNA Konzentration nach 0, 2, 4, 8 und 12h nach Zugabe von Actinomycin D bestimmt. Wie Abbildung 3.6 zeigt, änderte sich die Halbwertszeit der Renin mRNA unter Forskolin/ IBMX Behandlung nicht gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

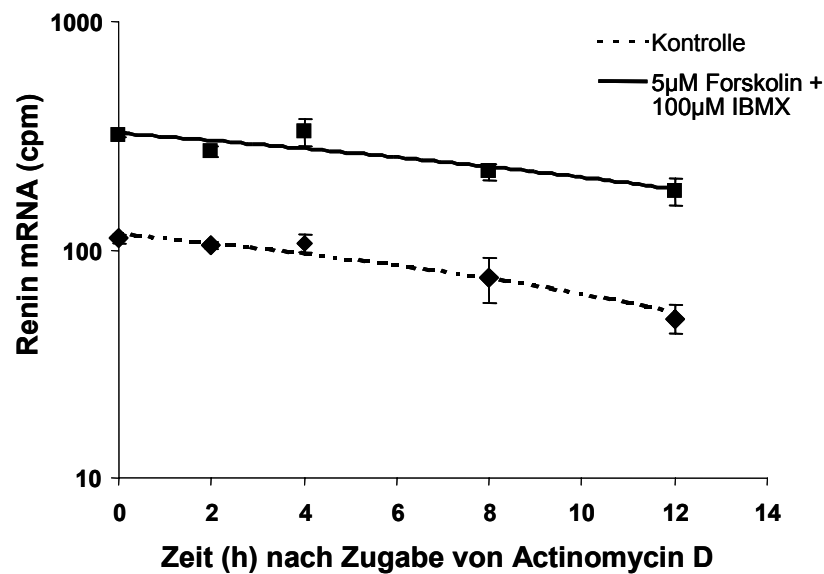


Abbildung 3.6: Einfluss von 5µM Forskolin und 100µM IBMX auf die Renin mRNA Stabilität in As4.1 Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die As4.1 Zellen wurden für 24h mit oder ohne (Kontrolle) 5µM Forskolin und 100µM IBMX inkubiert bevor 2µM Actinomycin D zugegeben wurde. Danach wurde nach 0, 2, 4, 8 und 12h die RNA isoliert und die Renin mRNA im Protection Assay quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die berechnete Regressionsgerade ist eingezeichnet.

3.1.5 Reningentranskription

Um festzustellen, ob der durch cAMP vermittelte Anstieg der Renin mRNA auf einer Erhöhung der Transkription des Reningens beruht, wurden Reninpromotor-Reporterkonstrukte erstellt. Es wurden Reninpromotor- Luziferase Konstrukte generiert, welche ein 2,8kb und ein 4,2kb großes Fragment des murinen Renin 1^C Promotors und das Gen der Luziferase des Leuchtkäfers enthielten. Die Aktivität der Luziferase, steht im direkten Verhältnis zur Menge des Luziferase- Proteins, welches in Abhängigkeit der Promotoraktivität gebildet wird. Diese Konstrukte wurden in As4.1 Zellen transfiziert und die Zellen anschliessend für 24h mit oder ohne (Kontrolle) Forskolin/ IBMX

inkubiert. Die Luziferaseaktivität (relative light units, RLU) wurde in einem Dual Luziferaseassay mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Um eine gleichmäßige Transfektionseffizienz sicher zu stellen, wurde zusätzlich zum Reninpromotor-Luziferase Konstrukt ein Konstrukt transfiziert, welches die Luziferase der Renilla konstitutiv exprimiert. Da beide Luziferasen eine unterschiedliche Substratspezifität haben, konnten die Aktivität der beiden in einem Reaktionsansatz gemessen werden. Bei der Messung wurde das Verhältnis der Aktivität der Luziferase (luc) des Leuchtkäfers zu der Aktivität der Renilla- Luziferase (ren) angegeben.

Es zeigte sich, dass Forskolin/ IBMX die Aktivität eines 4,2kb großen Reninpromotor-Fragments, welches an ein Luziferasegen gekoppelt ist, dreifach erhöhen kann. Diese Stimulation zeigte sich ebenfalls in einem 5'- verkürzten 2,8kb großen Fragment des Reninpromotors.

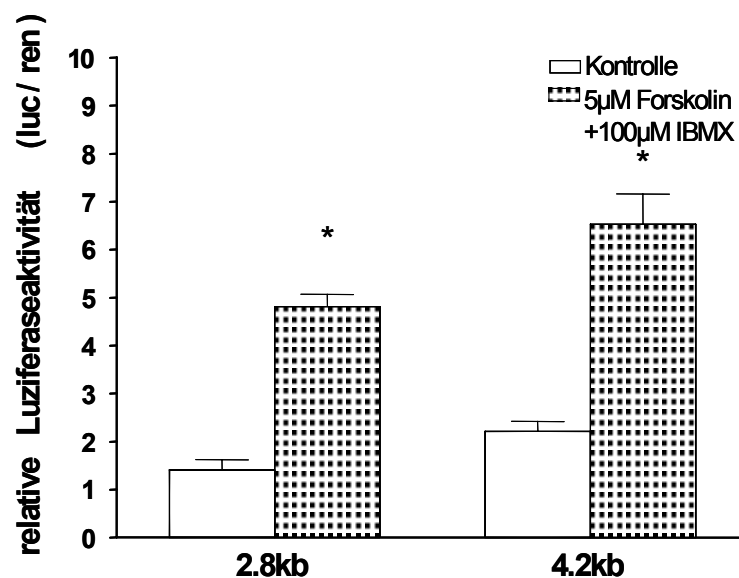


Abbildung 3.7: Einfluss von 5µM Forskolin/ 100µM IBMX auf die Reninpromotoraktivität. As4.1 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, welche ein 2,8kb und ein 4,2kb Fragment des murinen Renin 1^C Promotors enthielten. Die Luziferaseaktivität wurde bestimmt, nachdem die Zellen für 24h mit 5µM Forskolin/ 100µM IBMX behandelt wurden. Die Luziferaseaktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der Luziferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der Renilla. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Um eine weitere Einengung der regulatorischen Sequenz des Reninpromotors durchzuführen, welche den stimulatorischen Effekt vermittelt, wurden verschiedene Deletionskonstrukte des 2,8kb großen Reninpromotor Fragments erstellt, indem, wie in Material und Methoden beschrieben, zuerst ca. 500bp große Fragmente aus dem Promotorfragment entfernt wurden (a: 2,8kb Δ -2866 bis -2576; b: 2,8kb Δ -2576 bis -2188; c: 2,8kb Δ -2188 bis -1523; d: 2,8kb Δ -1523 bis -1092; e: 2,8kb Δ -1092 bis -536; f: 2,8kb Δ -536 bis -132). Anschliessend wurden diese Fragmente auf deren Stimulierbarkeit durch Forskolin/ IBMX überprüft. Die Konstrukte b-f zeigten sowohl eine im Vergleich zu dem 2,8kb großen Promotorfragment ähnliche basale transkriptionelle Aktivität als auch eine vergleichbare Stimulierbarkeit durch Forskolin/ IBMX. Das Konstrukt, in welchen der Bereich -2866 bis -2576 entfernt war, zeigte eine niedrige basale transkriptionelle Aktivität und es lies sich auch nicht mehr mit Forskolin/ IBMX stimulieren. Daraus wurde gefolgert, dass die für die cAMP-vermittelte Stimulierung der Reningentranskription nötige Sequenz, sich in diesen Bereich befindet. Weitere Konstrukte, die Deletionen in diesen Bereich enthielten, zeigten, dass die basale transkriptionelle Aktivität nur erniedrigt war, wenn der Bereich von -2682 bis -2576 entfernt wurde. Die Stimulierbarkeit des Reninpromotor-Luziferase Konstrukts wurde durch das Entfernen des Bereichs von -2797 bis -2682 aufgehoben, jedoch zeigte dieses Konstrukt eine dem 2,8kb Reninpromotorfragment vergleichbare basale transkriptionelle Aktivität. Alle anderen erstellten Konstrukte zeigten eine normale basale Promotoraktivität und alle waren durch Forskolin/ IBMX stimulierbar.

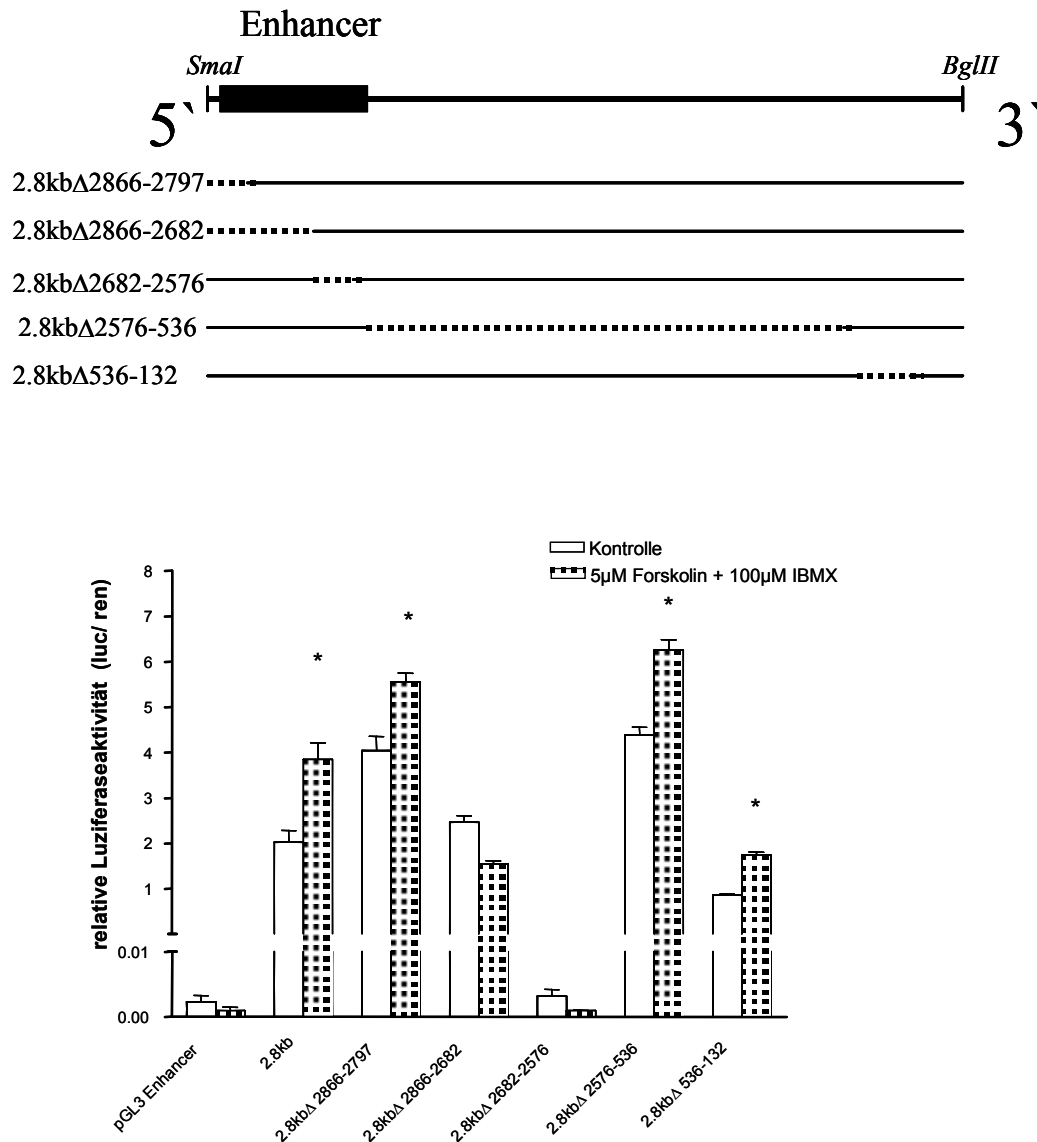


Abbildung 3.8: Einfluss von 5μM Forskolin/ 100μM IBMX auf die Reninpromotoraktivität. As4.1 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, welche Deletionen im 2,8kb Fragment des Renin 1^C Promotors enthalten. (2,8kbΔ-2866 bis -2797; 2,8kbΔ-2866 bis -2682; 2,8kbΔ-2682 bis -2576; 2,8kbΔ-2576 bis -536; 2,8kbΔ-536 bis -132). Die Luziferaseaktivität wurde bestimmt, nachdem die Zellen für 24h mit 5μM Forskolin/ 100μM IBMX behandelt wurden. Die Luziferaseaktivität ist angegeben als Verhältnis der Aktivität (RLU) der Luziferase zur Aktivität (RLU) der Renilla. Die Werte sind Mittelwerte ±SEM aus vier Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Im oberen Teil der Abbildung ist eine Graphik dargestellt, welche die Deletionskonstrukte skizziert. Der gepunktete Bereich wurde jeweils herausgeschnitten.

Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass der Bereich von -2797 bis -2576 für die cAMP-vermittelte Stimulierung der Reningentranskription wichtig ist. Um eine weitere Einengung der stimulatorischen Sequenz für den cAMP Signalübertransweg im murinen Renin 1^C Promotor durchzuführen, wurde mit Hilfe des MatInspectors V2.2 alle CRE- consensus Sequenzen im oben beschriebenen Bereich gesucht. Dabei wurden drei Bereich mit einer TGAC- Sequenz gefunden (C α : von -2698 bis -2691 : 5'caaTGACatcacta'3; C β : von -2674 bis -2667: 5'tggTGACctggctg; C γ : von 2657 bis -2650:5'ctcTGACctctgag'3), welche für eine cAMP- vermittelte Stimulierung von Promotoren nötig ist. Jede Stelle wurde durch eine Deletion von jeweils 4bp entfernt und es zeigte sich bei allen drei Stellen, dass eine Stimulierung des Reninpromotors mit Forskolin/ IBMX nicht mehr möglich war, während die basale Promotoraktivität durch die Deletion nur geringfügig beeinflusst wurde.

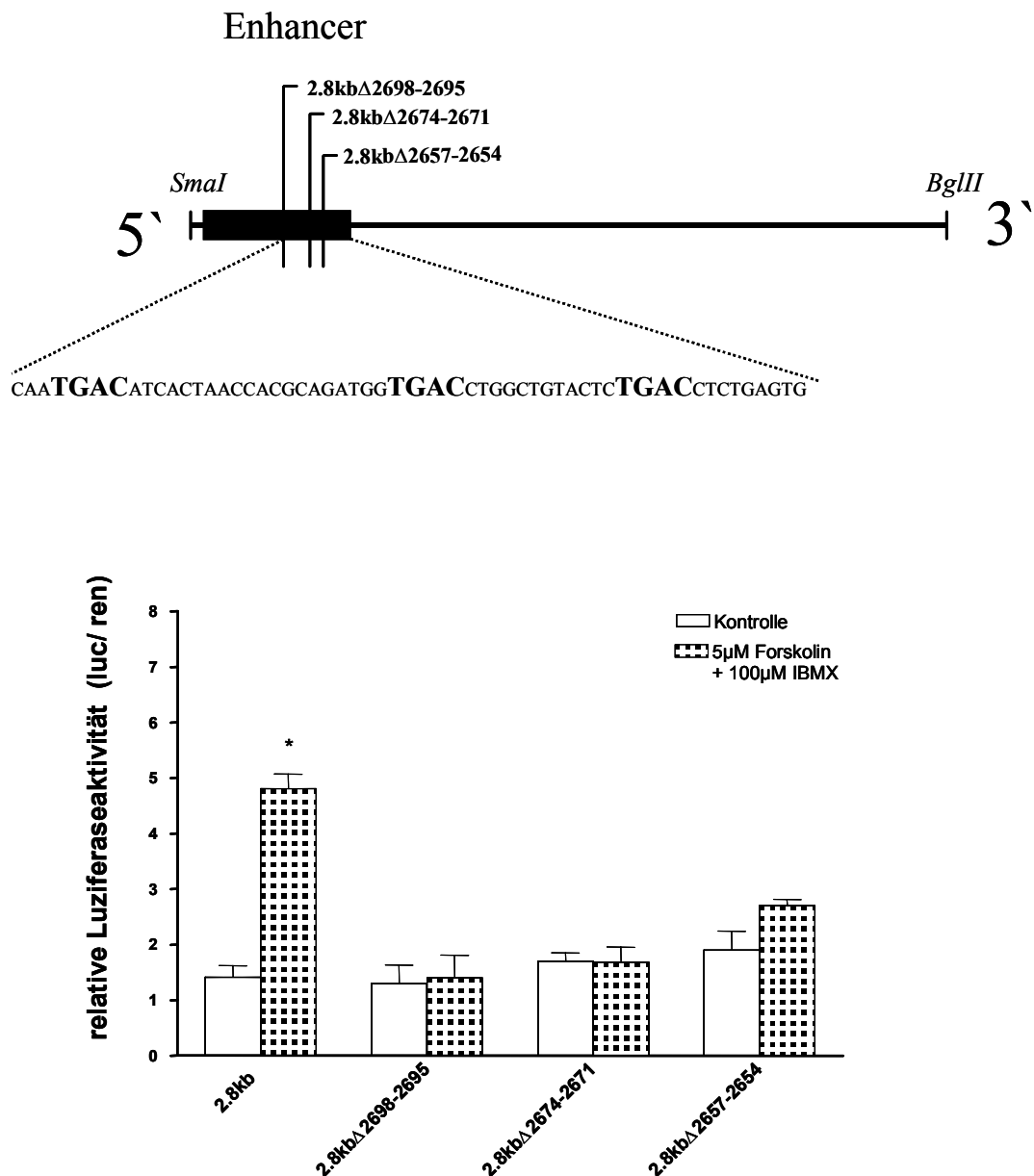


Abbildung 3.9: Einfluss von 5μM Forskolin/ 100μM IBMX auf die Reninpromotoraktivität. As4.1 Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, welche Deletionen im 2,8kb Fragment des Renin 1^C Promotors enthalten. (2,8kbΔ-2698 bis -2695; 2,8kbΔ-2674 bis -2671; 2,8kbΔ-2657 bis -2654) Die Luciferaseaktivität wurde nachdem die Zellen für 24h mit 5μM Forskolin/ 100μM IBMX behandelt wurden bestimmt. Die Luciferaseaktivität ist angegeben als Verhältnis der Aktivität (RLU) der Luciferase zur Aktivität (RLU) der Renilla. Die Werte sind Mittelwerte ±SEM von vier Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle. Der oberen Teil der Abbildung zeigt graphisch die mutmaßlichen CRE-consensus Sequenzen. Die hervorgehobenen Basen TGAC wurden jeweils deletiert.

3.1.6 CRE- bindendes Protein

Weitere Untersuchungen sollten nun die Rolle des an das cAMP responsive Element (CRE) bindende Protein (CREB) in der cAMP- vermittelten Stimulierung des Reninpromotors charakterisieren. Eine Western Blot Analyse mit einem anti-CREB und einem anti- phospho- CREB Antikörper zeigte, dass der Phosphorylierungsgrad des CRE- bindenden Proteins am Serin 133 unter Forskolin/ IBMX Stimulation höher ist als unter Kontrollbedingungen. Der verwendete anti- phospho- CREB Antikörper zeigte dabei die vom Hersteller beschriebene Kreuzreaktivität mit ATF-1, einem zu CREB homologen Transkriptionsfaktor.

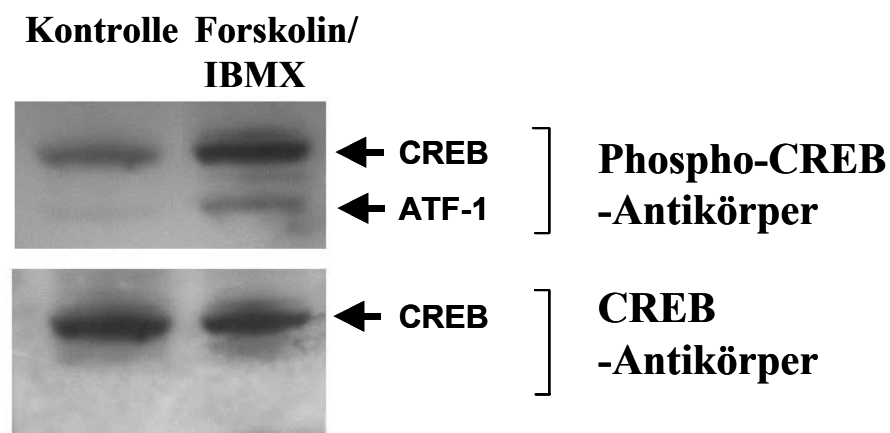


Abbildung 3.10: Western Blot Analyse mit Proteinextrakten (20µg pro Spur) von As4.1 Zellen, welche zuvor für 4h mit 5µM Forskolin/ 100µM IBMX behandelt wurden. Der obere Blot wurde mit dem anti- phospho- CREB Antikörper der untere mit dem anti- CREB Antikörper inkubiert.

Um die Beteiligung der CRE-consensus Sequenz an der cAMP- vermittelten Stimulierung der Renintranskription weitergehend zu untersuchen, wurde ein Gelshiftassay durchgeführt um eine mögliche Bindung des CRE-bindenden Proteins an die CRE- consensus Sequenzen zu zeigen. Aus den As4.1 Zellen wurde ein Kernextrakt hergestellt um in einer Gelshiftreaktion mit doppelsträngigen Oligonukleotiden, welche jeweils eine der möglichen CRE-consensus Sequenzen enthielten, eine DNA- Protein Interaktion nachzuweisen. Die Gelshiftreaktion mit dem Oligonukleotiden, welche die CRE- Sequenz von -2698 bis -2691 (5'atcctcccaaTGACATCActaaccacg'3) enthielt, zeigte einen einzelnen Komplex, welcher durch die Zugabe von unmarkierten Oligonukleotiden, welches die klassische CRE- Bindestelle enthielt (5'agagattgccTGACGTCAgagagctag'3), in steigender Konzentration (50x, 100x, 200x) wieder aufgelöst wurde. Durch die Zugabe von nicht spezifischen doppelsträngigen Oligonukleotiden (5ättcgatcggggcggggcgagc'3) war es nicht möglich den Komplex aufzulösen. Des weiteren konnte in einer Supershiftreaktion mit dem CREB-1 Antikörper, welcher an die DNA-bindende Proteinsequenz des CREB-1 Proteins bindet, eine Reduktion der DNA- Protein- Interaktion nachgewiesen werden.

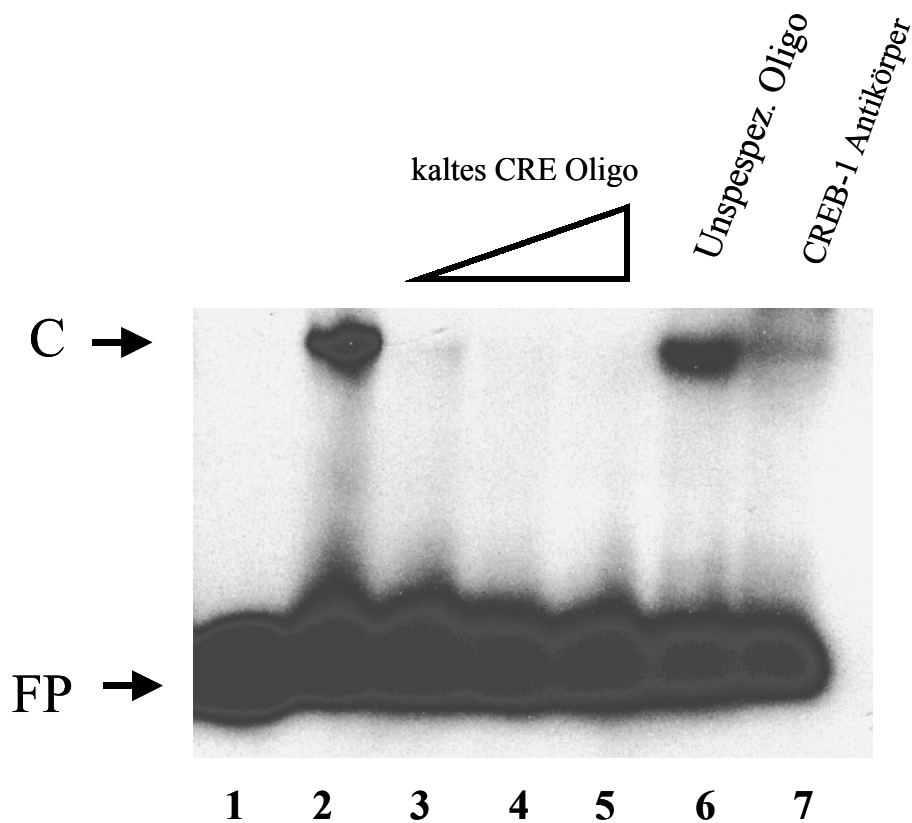


Abbildung 3.11: Gelshiftassay, in welchem Kernproteine von As4.1 Zellen verwendet wurden. Als DNA- Sonde wurden doppelsträngige Oligonukleotide verwendet, welche die Sequenz des murinen Renin 1^C Promotors von -2708 bis 2682 mit der mutmaßlichen CRE-consensus Sequenz enthielt. Spur 1: negativ Kontrolle; Spur 2: positiv Kontrolle mit As4.1 Zellkernextrakt; Spur 3-5: As4.1 Zellkernextrakt mit unmarkierten Oligonukleotiden (mit klassischer CRE- consensus Sequenz) im 50-, 100-, 200-fachen Überschuß gegenüber der markierten DNA- Sonde. Spur 6: As4.1 Zellkernextrakt mit unmarkierten Oligonukleotiden (200-facher Überschuß) ohne CRE-consensus Sequenz. Spur 7: As4.1 Zellkernextrakt mit zusätzlichem CREB-1 Antikörper. Der spezifische DNA- Protein Komplex wurde mit "C" gekennzeichnet, die freie DNA- Sonde mit "FP".

Für die doppelsträngigen Oligonukleotide, welche die möglichen CRE- consensus Sequenzen von -2674 bis -2667 (5'ggctgtactcTGACCTCTgagtggctg'3) und die CRE-consensus Sequenz von -2657 bis -2650 (5'ggctgtactcTGACCTCTgagtggctg'3) enthielten, konnte zwar ebenfalls die Bildung eines Komplexes gezeigt werden, jedoch

konnte diese DNA- Protein Interaktion nicht mehr durch die Zugabe des doppelsträngigen Oligonukleotides, welches die klassische CRE- Bindestelle enthält, aufgehoben werden.

Aus diesen Daten kann auf eine Beteiligung des CREB-1 Proteins, welches eine DNA-Protein Interaktion mit der CRE- consensus Sequenz von -2698 bis 2691 eingeht, an der cAMP vermittelten Reningentranskription geschlossen werden.

3.2 Einfluss und Wirkungsweise von Aldosteron auf die Renin mRNA

Die Reninsynthese und die Reninsekretion werden durch das Renin- Angiotensin- Aldosteron System über eine negative Rückkopplung reguliert. Aktivierung der Reninsynthese und Reninsekretion führt über eine verstärkte Bildung von Angiotensin II zum Blutdruckanstieg und zum Anstieg des renalen Perfusionsdrucks, was über den renalen „Barorezeptor“ wiederum die Sekretion und Synthese des Renins hemmt. Die vermehrte Bildung von Angiotensin II und Aldosteron erhöht auch die Rückresorption von Natrium in der Niere und erhöht dadurch den Salzgehalt des Körpers. Ein erhöhter Natriumgehalt hemmt wiederum die Reninsynthese (Hackenthal et al., 1990; Kurtz und Wagner, 1999). Weiterhin beobachtet man auch eine direkte Hemmung der Reninsekretion und Reninsynthese in den JG- Zellen durch Angiotensin II, welches über den Angiotensin II AT-1 Rezeptor vermittelt wird (Hackenthal et al., 1990; Wagner et al., 1998). Ob auch Aldosteron ähnlich wie Angiotensin II neben indirekten Wirkungen auch einen direkten Einfluss auf die Reninsynthese bzw. Reninsekretion hat, ist bislang unbekannt. Interessanterweise weisen vorläufige Befunde anderer Arbeitsgruppen darauf hin, dass auch JG- Zellen in situ Rezeptoren für Aldosteron exprimieren könnten, was eine Wirkung von Aldosteron auf die JG- Zellen nahelegen würde. Ich habe deshalb untersucht, ob auch Aldosteron eine direkte Wirkung auf die Renin mRNA Konzentration und Reninsekretion in juxtaglomerulären Zellen hat.

3.2.1 Expression des Mineralokortikoid- Rezeptors in juxta-glomerulären Zellen

Um festzustellen, ob das Gen des aldosteronbindenden Mineralokortikoid- Rezeptors in der juxtaglomerulären Region tatsächlich exprimiert wird, wurden aus Mäusenieren (C57/Black 6) Glomeruli mit kurzen afferenten Arteriolen mikrodissseziert und gesammelt. Die RNA wurde isoliert und auf Mineralokortikoid- Rezeptor mRNA hin mittels RT- PCR analysiert. Ebenso wurde RNA aus einer primären JG- Zellkultur aus Mausnieren (C57/ Black 6) isoliert und in gleicher Weise analysiert. Wie in Abbildung 3.12 zu sehen ist, wurde die mRNA des Mineralokortikoid- Rezeptors sowohl in den Glomeruli mit afferenter Ateriole als auch in der primären JG- Zellkultur gefunden. Auch in der juxtaglomerulären Zelllinie As.4.1 lies sich Mineralokortikoidrezeptor mRNA gut nachweisen.

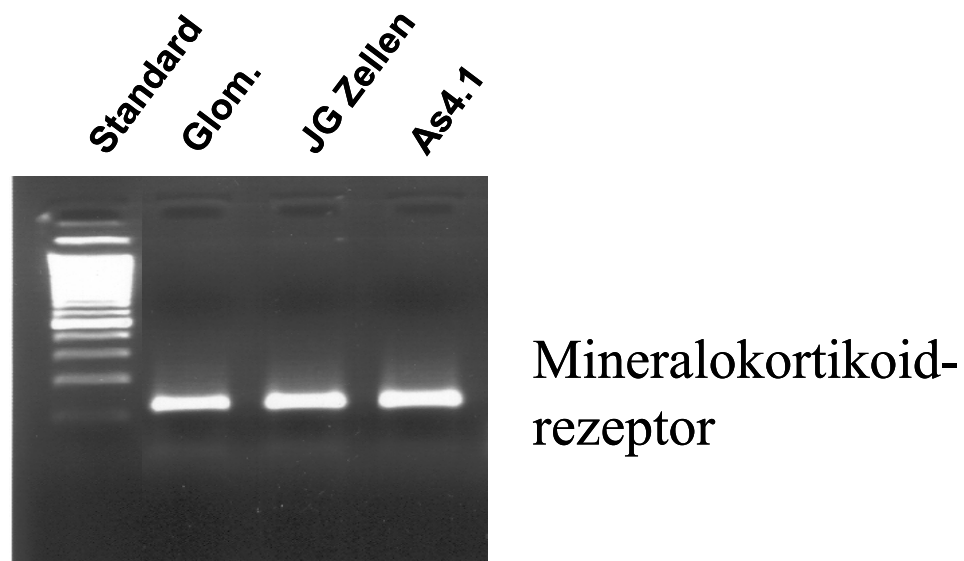


Abbildung 3.12: Ethidiumbromid gefärbtes 2% Agarosegel mit den PCR- Produkt des Mineralokortikoidrezeptors in murinen Glomeruli mit afferenten Ateriolen, in nativen JG- Zellen und As4.1 Zellen.

3.2.2 Wirkung von Aldosteron auf die Maus JG- Zellen in Primärkultur

Um einen möglichen Einfluss von Aldosteron auf die Reningenexpression zu prüfen, wurden Primärkulturen von Maus JG-Zellen für 24h mit 100nM Aldosteron inkubiert, und anschliessend wurde die Renin mRNA mittels Real-time RT-PCR semiquantifiziert. Es ergab sich, dass Aldosteron keinen Einfluss auf die basale Renin mRNA Abundanz ausübte. Eine Aktivierung des cAMP Signalweges durch den β -Adrenorezeptoragonisten Isoproterenol erhöhte die Renin mRNA Konzentration erwartungsgemäss 2-3 fach. In Gegenwart von Isoproterenol zeigte Aldosteron eine Wirkung, in dem es die cAMP induzierte Steigerung der Renin mRNA noch weiter verstärkte.

Parallel zu diesen Versuchen habe ich auch den Einfluss von Aldosteron (100nM) auf die Sekretion von Renin und somit die Exocytose von vesikulären Renin gemessen. Dazu wurden Primärkulturen von Maus JG-Zellen für 24 h mit Aldosteron inkubiert. Anschliessend wurde die Reninaktivität im Zellkulturüberstand und in den Zellen bestimmt. Die Reninsekretion wurde als fraktionelle Freisetzung d.h. als Verhältnis von Reninaktivität im Zellkulturüberstand zur gesamten Reninaktivität (Summe aus Reninaktivität im Überstand und in den Zellen) bestimmt. Mit diesem Verfahren werden Ungenauigkeiten, die aus unterschiedlichen absoluten Zellzahlen in den Minikulturschalen resultieren, minimiert. Unter Kontrollbedingungen wie auch in Gegenwart von Aldosteron sezernierten die Zellen ca. 15% des gespeicherten Renins. Isoproterenol erhöhte die Reninsekretion auf 34% des gespeicherten Renins. Auch in Gegenwart von Isoproterenol zeigte Aldosteron keine Wirkung auf die Reninsekretion (Abbildung 3.13).

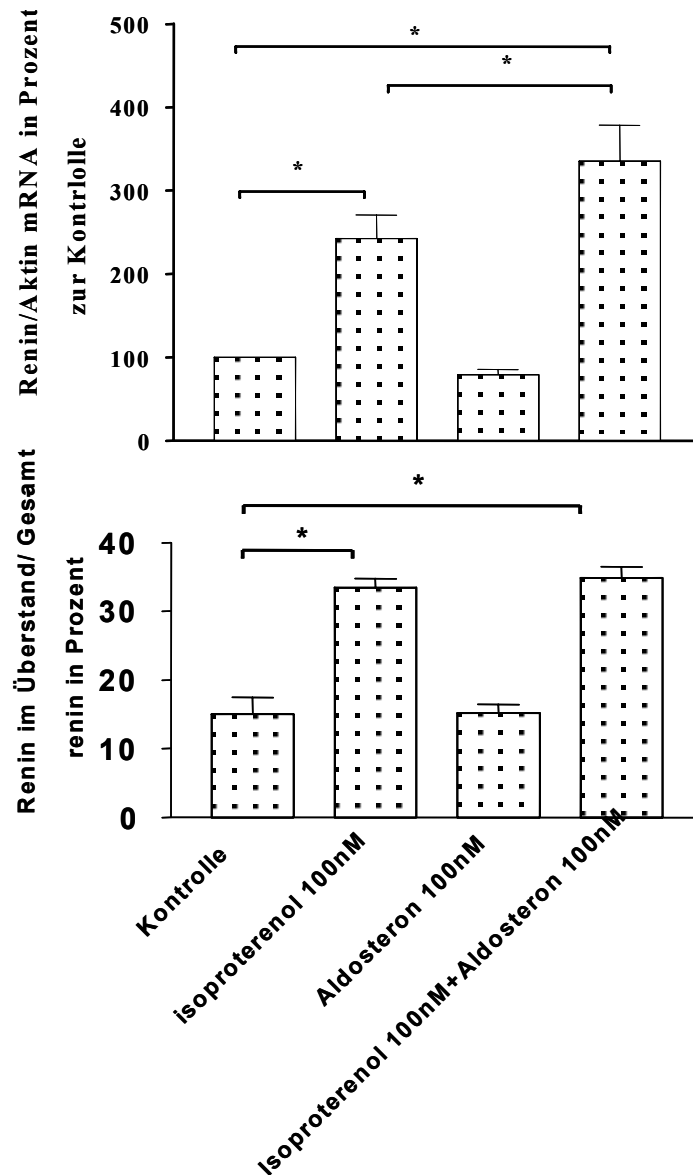


Abbildung 3.13: Wirkung von Aldosteron und Isoproterenol auf die Expression der Renin mRNA und auf die Reninsekretion in isolierten nativen JG- Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit 100nM Aldosteron, 10nM Isoproterenol und einer Kombination der beiden Substanzen inkubiert. Oben: Die Renin mRNA wurde mittels Real- time PCR quantifiziert und auf die β -Aktin mRNA bezogen.

Unten: Reninsekretion wurde aus dem Verhältnis des Reningehalts im Medium zum Gesamtreningehalt bestimmt. Die Werte sind jeweils Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

3.2.3 Wirkung von Aldosteron auf die juxtaglomeruläre Zelllinie As4.1

Zur näheren Charakterisierung der Regulation des Reningenexpression durch Aldosteron auf zellulärer-molekularer Ebene wurde die immortalisierte murine JG-Zelllinie As4.1 verwendet, welche ebenfalls das Gen für den Mineralokortikoid-Rezeptor exprimiert (Abbildung 3.12).

Um den Einfluss von Aldosteron auf die Expression des Renings in As4.1 Zellen zu untersuchen, habe ich die Zellen zunächst für verschiedene Zeitintervalle mit 100nM Aldosteron inkubiert. Anschliessend wurde die RNA isoliert und mittels eines RNase Protektionsassays die Renin mRNA semiquantifiziert. Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, stieg in Gegenwart von 100nM Aldosteron die Renin mRNA Konzentration nach einer Latenz von etwa 8h an und erreichte nach 24h ein Plateau, welches 2,5 fach gegenüber dem Kontrollwert erhöht war.

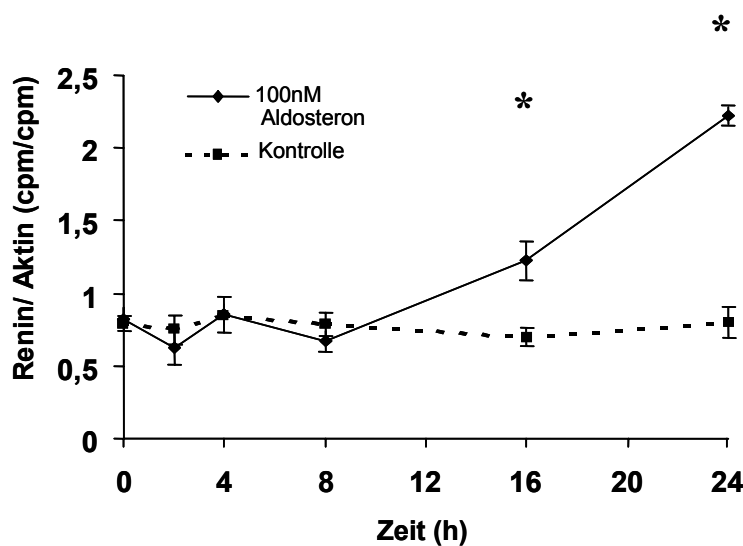


Abbildung 3.14: Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen, die mit 100nM Aldosteron für 0, 2, 4, 8, 12, 24h inkubiert wurden. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Aldosteron auf die Renin mRNA wurden die As4.1 Zellen mit 0nM, 1nM, 10nM, 100nM und 1µM Aldosteron für 24h inkubiert. Der Effekt von Aldosteron auf die Renin mRNA Expression war dabei, wie Abbildung 3.15 zeigt, konzentrationsabhängig mit einer halbmaximalen Wirkung zwischen 10 und 100nM.

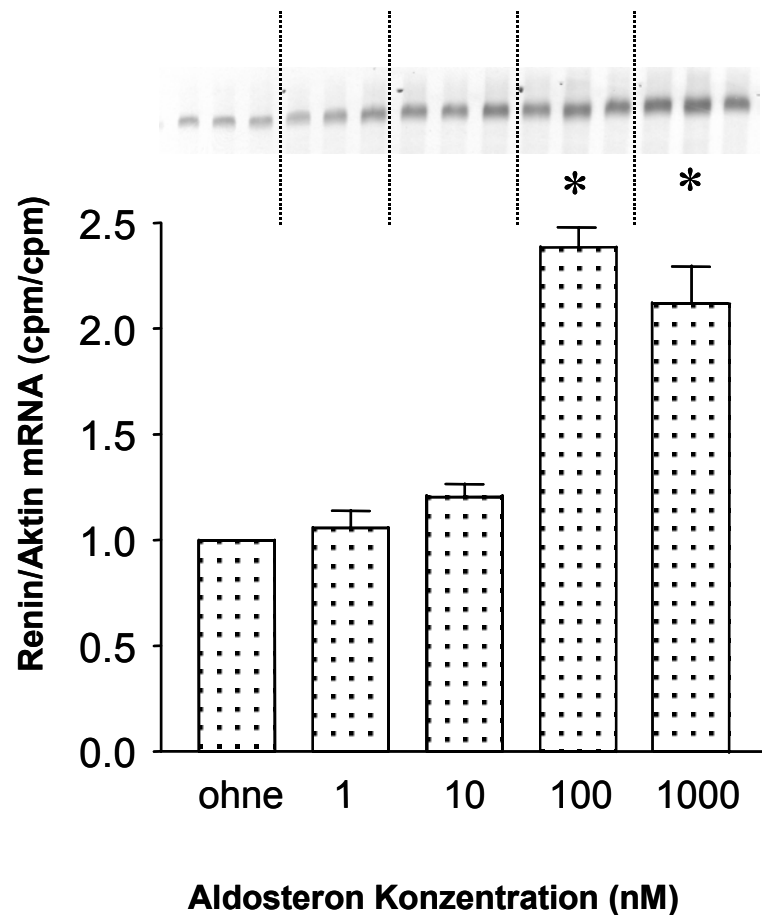


Abbildung 3.15: Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an Aldosteron (ohne, 1nM, 10nM, 100nM und 1µM) inkubiert wurden. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Um eine Beteiligung des Mineralokortikoid- Rezeptors an der Wirkung von Aldosteron auf die Renin mRNA zu überprüfen, wurden die Zellen für 24h mit einer Kombination aus 100nM Aldosteron und 10 μ M Spironolacton, einem spezifischen Blocker des Mineralokortikoid- Rezeptors, inkubiert. Anschliessend wurde die RNA isoliert und mittels eines RNase Protektionsassays die Renin mRNA semiquantifiziert. Es zeigte sich, dass die Wirkung von 100nM Aldosteron auf die Renin mRNA durch 10 μ M Spironolacton aufgehoben wurde.

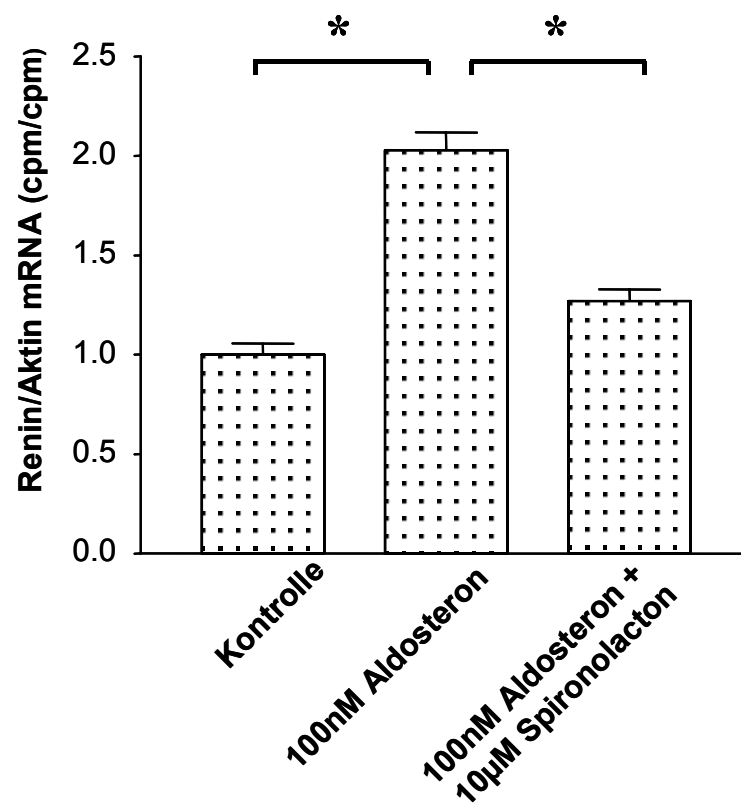


Abbildung 3.16: Der Einfluss von 100nM Aldosteron in der Kombination mit 10 μ M Spironolacton auf die Renin mRNA in As4.1 Zellen nach 24 stündiger Inkubation. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Um die Steroidspezifität der Wirkung von Aldosteron auf die Renin mRNA Expression abzuklären, habe ich neben Aldosteron auch noch den Einfluss anderer Steroide, nämlich Cortison, Corticosteron, Hydrocortison, Östradiol und Testosteron auf die Renin mRNA Abundanz bestimmt. Wie in Abbildung 3.17 dargestellt ist, erhöhte eine 24h Inkubation mit 100nM Corticosteron oder mit 100nM Hydrocortison die Renin mRNA Abundanz etwa dreifach. 100nM Cortison induzierte eine zweifache Erhöhung der Renin mRNA Konzentration 100nM Östradiol und 100nM Testosteron hatten keinen Einfluss auf die Abundanz der Renin mRNA in As4.1 Zellen.

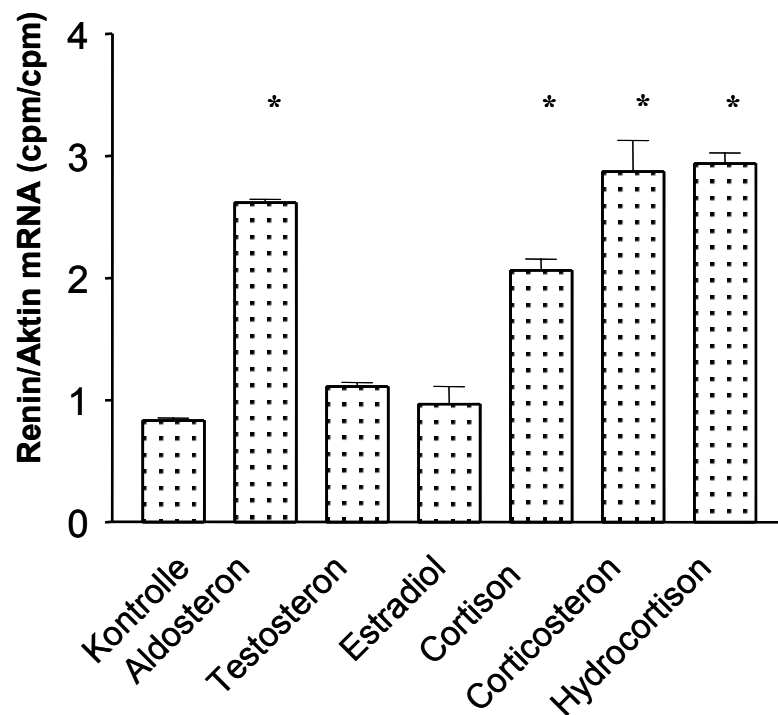


Abbildung 3.17: Einfluss von 100nM Aldosteron, 100nM Testosteron, 100nM Estradiol, 100nM Cortison, 100nM Corticosteron und 100nM Hydrocortison auf die Renin mRNA nach 24h Inkubation. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

3.2.4 Mechanismus der Aldosteronwirkung auf die Reningen Expression

Ein Anstieg der Renin mRNA Konzentration kann durch eine erhöhte Stabilität der Renin mRNA oder durch eine gesteigerte Transkription des Reningens hervorgerufen werden. Um abzuklären, ob die Transkription des Reningens durch Aldosteron gesteigert wird, wurden As4.1 Zellen transient mit Reninpromotor- Luziferase-Konstrukten transfiziert und anschliessend mit Aldosteron inkubiert. Diese Konstrukte entsprechen denjenigen, welche bereits unter 3.1.5 beschrieben wurden. Weder mit einem 4,2kb noch mit einem 2,8kb großem Reninpromotorfragment konnte jedoch eine Änderung in der Luziferaseaktivität nach 30 stündiger Inkubation mit 100nM Aldosteron gegenüber der Kontrolle gemessen werden.

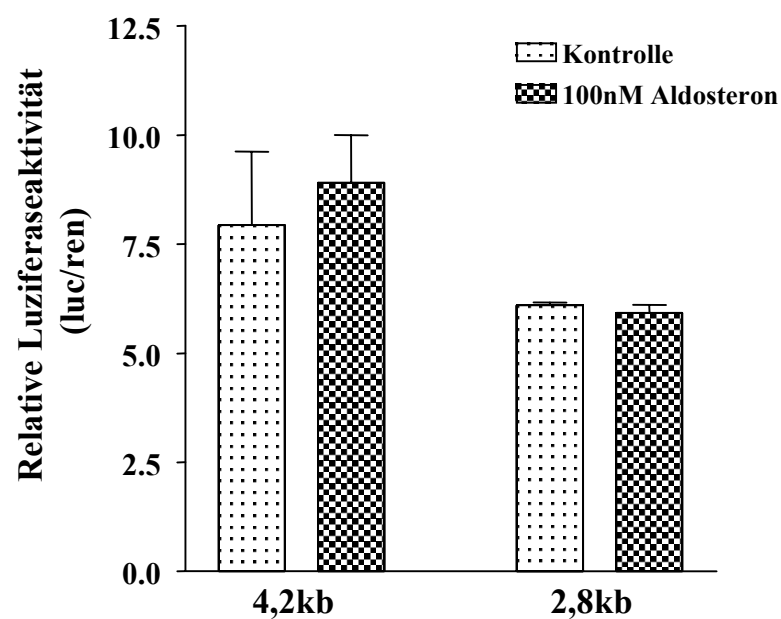


Abbildung 3.18: Einfluss von 100nM Aldosteron auf die Aktivität des Reninpromotors. Die As4.1 Zellen wurden mit einem 4,2kb und einem 2,8kb großem Reninpromotorfragment des Renin 1^C Gens transient transfiziert und nach 30h Inkubation mit 100nM Aldosteron wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Die Luziferaseaktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der Luziferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der Renilla. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von vier Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Eine mögliche Wirkung von Aldosteron auf die Renin mRNA Stabilität wurde durch Bestimmung der Renin mRNA Halbwertszeit überprüft. Dazu wurden Zellen für 24h mit oder ohne (Kontrolle) 100nM Aldosteron inkubiert, bevor die gesamte Transkription durch 2 μ M Actinomycin D gehemmt wurde. Anschliessend wurde die Renin mRNA mittels eines RNase- Protectionassays nach 2, 4, 8 und 12h semiquantifiziert und daraus die Abbaurrate der Renin mRNA in Gegenwart und Abwesenheit von Aldosteron berechnet. Wie in Abbildung 3.19 zu sehen, ist die Abbaurrate der Renin mRNA in As4.1 Zellen in der Gegenwart von Aldosteron niedriger als unter Kontrollbedingungen. Die errechnete Halbwertszeit für die Renin mRNA lag bei 10h in Abwesenheit und bei 38h in Abwesenheit von Aldosteron im Kulturmedium.

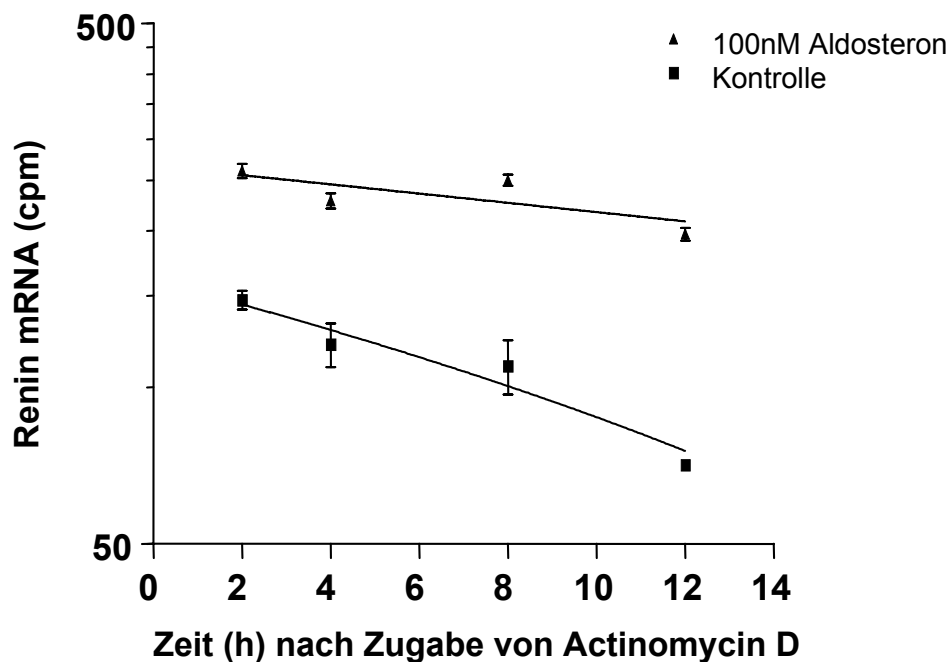


Abbildung 3.19: Einfluss von 100nM Aldosteron auf die Renin mRNA Stabilität in As4.1 Zellen. Die As4.1 Zellen wurden für 24h mit oder ohne (Kontrolle) 100nM Aldosteron inkubiert bevor 2 μ M Actinomycin D zugeben wurden. Danach wurde nach 2, 4, 8 und 12h die RNA isoliert und die Renin mRNA mittels eines RNase- Protection Assays quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die berechnete Regressionsgerade ist eingezeichnet.

3.2.5 Interaktion zwischen dem Aldosteron- und dem cAMP Signalweg

Da der cAMP- Signalweg der am besten charakterisierte und der stärkste bekannte Stimulus für die Expression des Reningens ist, lag es nahe abzuklären, ob Aldosteron möglicherweise auch irgendwie mit dem cAMP-Signalweg interferiert. Ich habe deshalb in As4.1 Zellen den cAMP Signalweg mit einer Kombination aus Adenylatzyklasestimulation (Forskolin) und Phosphodiesterasehemmung (IBMX) kräftig stimuliert, und unter dieser Bedingung dann den Einfluss von Aldosteron auf die Renin mRNA Abundanz bestimmt. Wie bereits gesehen, erhöhte die Kombination aus Forskolin und IBMX deutlich sowohl die Proreninsekretion, die Renin mRNA Konzentration, wie auch die Promotoraktivität des Reningens. Aldosteron verstärkte die cAMP induzierte Stimulation der Renin mRNA noch weiter, veränderte aber die Aktivierung der Reninpromoteraktivität durch cAMP nicht mehr (Abbildung 3.20).

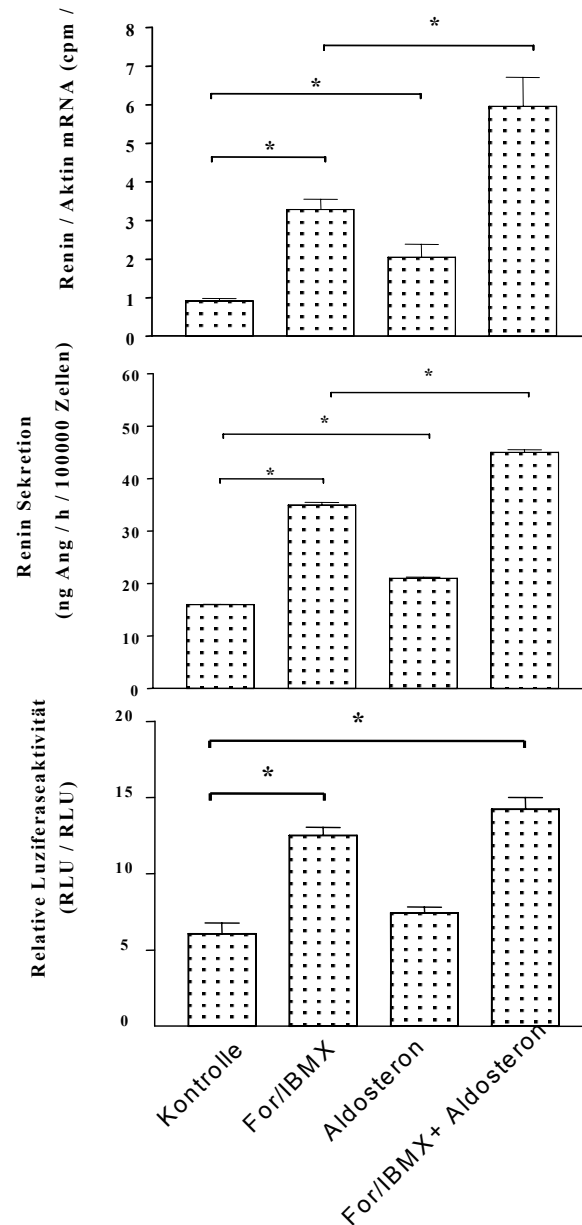


Abbildung 3.20: Einfluss von Aldosteron in Kombination mit Forskolin/ IBMX auf die Reningentranskription, Reninsekretion und die Promotoraktivität des Renings. Oben: Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen nach Inkubation mit 5 μ M Forskolin/ 100 μ M IBMX, 100nM Aldosteron und die Kombination mit beiden für 30h zu sehen. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Mitte: Reninsekretion aus As4.1 Zellen welche mit 5 μ M Forskolin/ 100 μ M IBMX, 100nM Aldosteron und der Kombination aus beiden für 30h inkubiert wurden. Unten: Promotoraktivität eines transient transfizierten 4,2kb großen Promotorfragments des murinen Renin 1^C Gens nach Stimulation mit 5 μ M Forskolin/ 100 μ M IBMX, 100nM Aldosteron und der Kombination aus beiden für 30. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von sechs Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

3.2.6 Wirkung von Aldosteron auf die Reninsekretion in der isoliert perfundierten Niere

Wie die Versuche an As4.1 Zellen und nativen JG- Zellen in vitro zeigten, erhöhte Aldosteron zwar die Expression des Reningens, jedoch ergab sich in der Primärkultur von Maus JG- Zellen kein Einfluss des Aldosterons auf die Exozytose von gespeichertem Renin. Um einen möglicherweise schnellen (nicht-genomischen?) Effekt von Aldosteron auf die Reninsekretion nicht zu übersehen, wurde der Einfluss von Aldosteron auch auf die Reninsekretion aus der isoliert perfundierten Rattenniere bestimmt. Mit diesem Modell können Veränderungen der Reninsekretion im Minuten- bis Stundenbereich zuverlässig gemessen werden. Es zeigte sich, dass Aldosteron bis in den supraphysiologischen mikromolaren Konzentrationsbereich hinein keinen Einfluss auf die basale Reninsekretion ausübte. Stimulation des cAMP-Signalweg mit dem β -Adrenorezeptoragonisten Isoproterenol hingegen erhöhte die Reninsekretionsrate kräftig etwa um den Faktor 12. Auch in Gegenwart von Isoproterenol veränderte Aldosteron die Reninsekretionsrate in den isolierten Nieren nicht (Abbildung 3.21). Es daher nicht davon auszugehen, dass Aldosteron die Exozytose von Renin in physiologisch relevanter Weise beeinflusst.

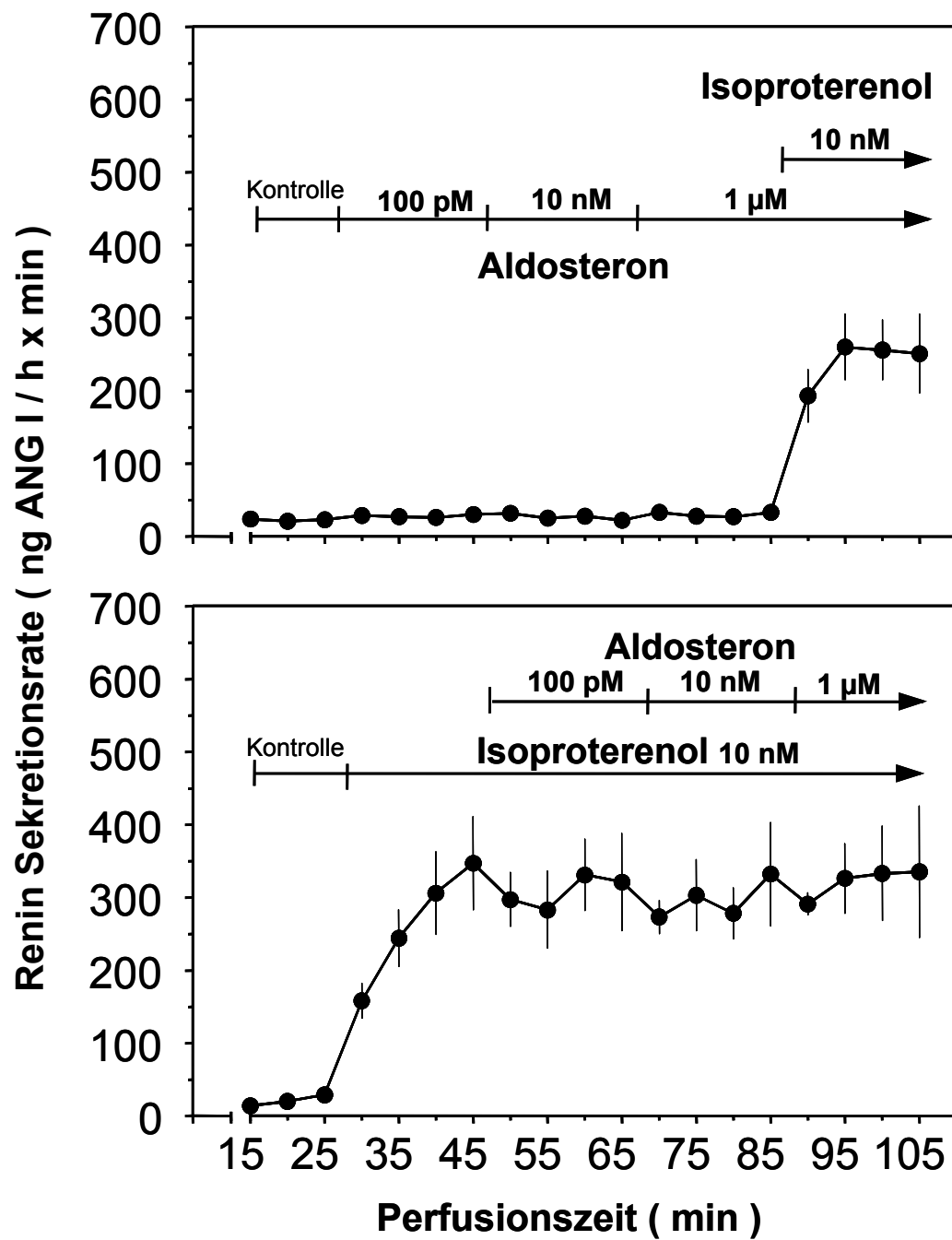


Abbildung 3.21: Einfluss von Aldosteron (100pM, 10nM und 1μM) auf die Reninsekretionsrate in der isolierten perfundierten Rattenniere. Die Rattenniere wurde mit Aldosteron allein (A) oder in der Kombination mit 10nM Isoproterenol (B) perfundiert.

3.3 Einfluss von TGF- β I und TGF- β II auf die Reningen Expression

Mitglieder der Transforming growth factor β (TGF- β) Superfamilie sind wichtige Regulatoren der Zellproliferation, des Wachstumsmusters und der Gestaltbildung. (Massague et al., 2000, Derynck et al., 2001; Miyazono et al., 2000). Darüberhinaus ist TGF- β nicht nur für die Gewebeentwicklung wichtig, sondern spielt auch im adulten Organismus eine bedeutsame Rolle, wo es z.B. an der Entwicklung der myokardialen Hypertrophie (MacLellan et al., 1993) oder am Überleben bzw. an der Induktion der Apoptose von Neuronen beteiligt ist (Kriegstein et al., 2002) TGF- β bindet an den TGF- β Rezeptorkomplex und löst dadurch eine Autophosphorylierung des Rezeptors aus. Dies wiederum aktiviert die cytosolischen Smad- Proteine, die daraufhin in den Zellkern einwandern können und dort als Transkriptionsfaktoren wirken (Derynck et al., 2001). Auch die adulte Niere exprimiert TGF- β und die Rezeptoren für TGF- β , wobei auffallend ist, dass die Expression der TGF- β Rezeptoren hauptsächlich auf die juxtaglomerulären Zellen beschränkt ist (Liu und Ballermann, 1998). Dies lässt vermuten, dass TGF- β auch dort einen physiologischen Einfluss ausübt, insbesondere auf die Reninsekretion bzw. Reninsynthese in diesen Zellen. Um herauszufinden ob TGF- β , und damit auch der Smad- Signalweg, auf die Reninsynthese tatsächlich einen Effekt hat, habe ich den Einfluss von TGF- β auf JG-Zellen in vitro und auf die juxtaglomeruläre Zelllinie As4.1 näher charakterisiert.

3.3.1 Expression der Rezeptoren TGF- β I und TGF- β II in JG-Zellen in vitro

Die Expression der Rezeptoren für TGF- β (Typ I und Typ II) wurden von Ballermann et al., 1998 für die juxtaglomeruläre Region in situ beschrieben. Es sollte nun zuerst überprüft werden, ob die Gene der Rezeptoren für TGF- β (Typ I und Typ II) auch in isolierten JG-Zellen und in der Zelllinie As4.1 exprimiert werden. Dabei zeigte sich, dass sowohl in den As4.1 Zellen als auch in den nativen JG- Zellen mRNAs für die beiden TGF- β Rezeptoren (Typ I und Typ II) mit RT-PCR hoch abundant bei 32 PCR-Zyklen nachgewiesen werden konnte.

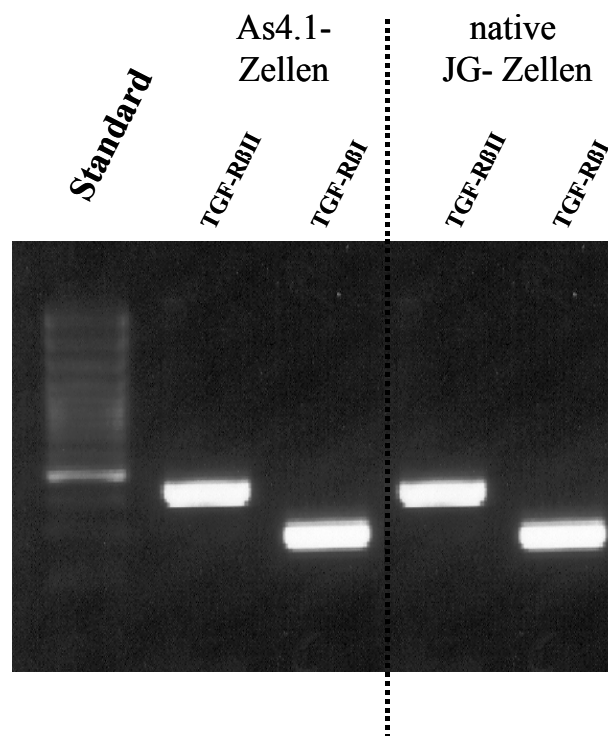


Abbildung 3.23: Ethidiumbromid gefärbtes 2% Agarosegel mit den PCR- Produkten für den TGF- β I Rezeptor und den TGF- β II in nativen JG- Zellen und As4.1 Zellen.

3.3.2 Die Wirkung von TGF- β I und TGF- β II auf As4.1 Zellen und native JG- Zellen

Angesichts der Expression von TGF- β Rezeptoren wurde nun in einem nächsten Schritt untersucht, ob TGF- β auch die Reningenexpression in den nativen JG-Zellen und in den As4.1. Zellen beeinflusst. Hierzu wurden zunächst As4.1 Zellen für verschiedene Zeitintervalle (0h, 2h, 4h, 8h, 16h und 24h) mit 0,1ng/ml TGF- β I oder 1ng/ml TGF- β II inkubiert und die Renin mRNA Abundanz wurde anschliessend mittels RNase Protektionassay semiquantifiziert. Es ergab sich, dass sowohl TGF- β I als auch TGF- β II die Renin mRNA Abundanz zeitabhängig auf 50% des Kontrollwertes verminderte (Abbildung 24). Der Abfall der Renin m-RNA erfolgte dabei in den ersten acht Stunden nach Zugabe von TGF- β , wonach sich die Renin mRNA Abundanz wiederum auf ein stabiles Plateau einstellte.

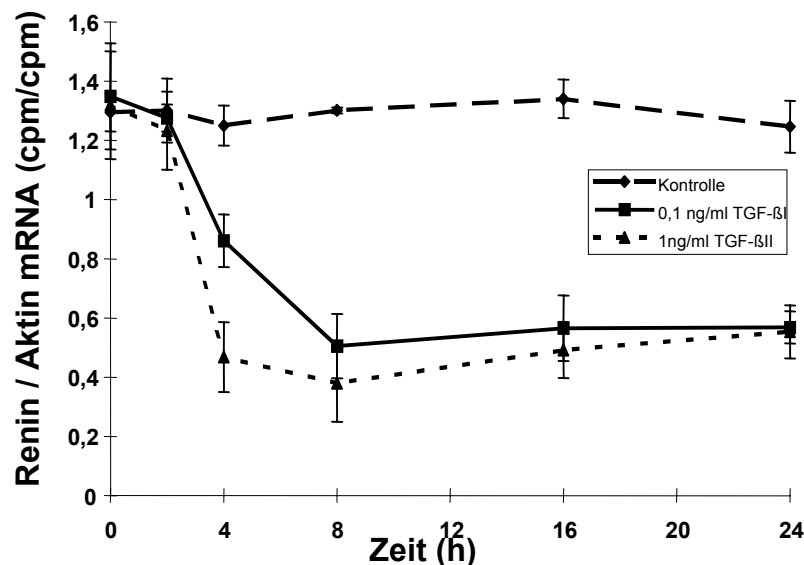


Abbildung 3.24: Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen, die für verschiedene Zeiten (0h, 2h, 4h, 8h, 16h und 24h) mit 0,1ng/ ml TGF- β I oder 1ng/ ml TGF- β II inkubiert wurden. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe erstellt wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von TGF- β I und TGF- β II auf die Renin mRNA Abundanz zu ermitteln, wurden As4.1 Zellen für 24h mit verschiedenen Konzentrationen von TGF- β I und TGF- β II inkubiert. Für beide Faktoren ergaben sich deutliche Konzentrationsabhängigkeiten, wobei die halbmaximale Hemmwirkung (IC_{50}) für TGF- β I bei 0,05ng/ ml und für TGF- β II bei 0,5ng/ ml lag (Abbildung 3.25).

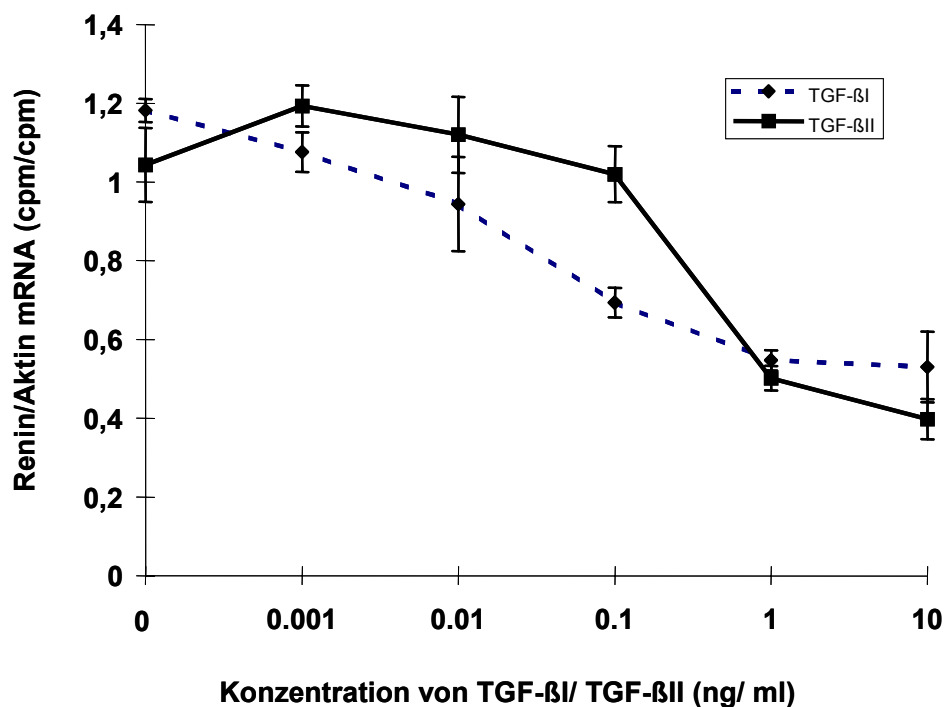


Abbildung 3.25: Renin mRNA Abundanz in As4.1 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen an TGF- β I oder TGF- β II (ohne, 0,001ng/ ml; 0,01ng/ ml; 0,1ng/ ml; 1ng/ ml; 10ng/ ml) für 24 Stunden inkubiert wurden. Die Werte geben das Verhältnis des Renin mRNA zum β -Aktin mRNA Hybridisierungssignal wider, welches von der selben RNA Probe gewonnen wurde. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von fünf Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Ich überprüfte dann, ob TGF- β I bzw. TGF- β II auch in isolierten nativen JG- Zellen die Renin mRNA Abundanz reduziert. Dazu wurden isolierte native JG- Zellen mit 0,1ng/ ml TGF- β I bzw 1ng/ ml TGF- β II für 24h inkubiert. Real time RT-PCR Analyse zeigte,

dass 0,1 ng/ ml TGF- β I die Renin mRNA Abundanz auf 76% und 1ng/ ml TGF- β II auf 78% des Kontrollwertes erniedrigte.

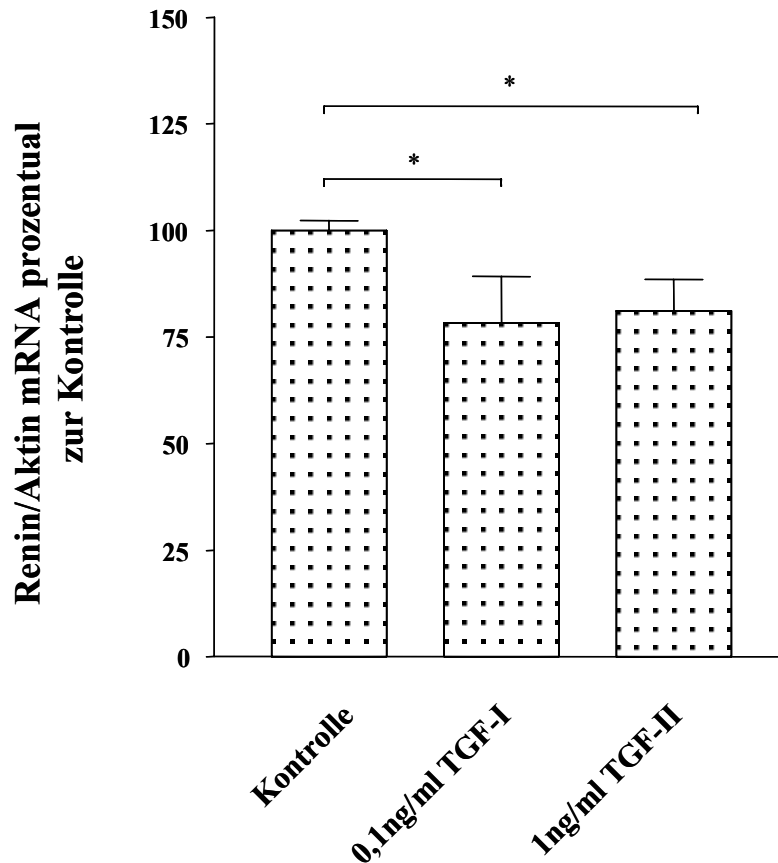


Abbildung 3.26: Renin mRNA Konzentration in nativen JG- Zellen, die für 24h mit 0,1ng/ ml TGF- β I oder 1ng/ ml TGF- β II inkubiert wurden. Die RNA wurde isoliert und die Renin mRNA mittels Real- time PCR quantifiziert und auf die β -Aktin mRNA bezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

In einem nächsten Schritt habe ich dann untersucht, ob TGF- β I und TGF- β II auch die Exozytose von gespeichertem aktivem Renin in isolierten nativen JG Zellen beeinflusst. Hierzu wurden Primärkulturen von Maus-JG Zellen für 24 Stunden mit 0,1ng/ ml TGF- β I oder 1ng/ ml TGF- β II inkubiert. Anschliessend wurde die Reninaktivität im

Zellkulturüberstand und in den Zellen bestimmt. Die Reninsekretion wurde als fraktionelle Freisetzung d.h. als Verhältnis von Reninaktivität im Zellkulturüberstand zur gesamten Reninaktivität (Summe aus Reninaktivität im Überstand und in den Zellen) bestimmt. Mit diesem Verfahren werden Ungenauigkeiten, die aus unterschiedlichen absoluten Zellzahlen in den Minikulturschalen resultieren, minimiert. Während die Zellen unter Kontrollbedingungen ca. 26% des gespeicherten Renins in 24h sezernierten, fiel die Sekretionsrate signifikant auf 22% mit TGF- β I und auf 20% mit TGF- β II.

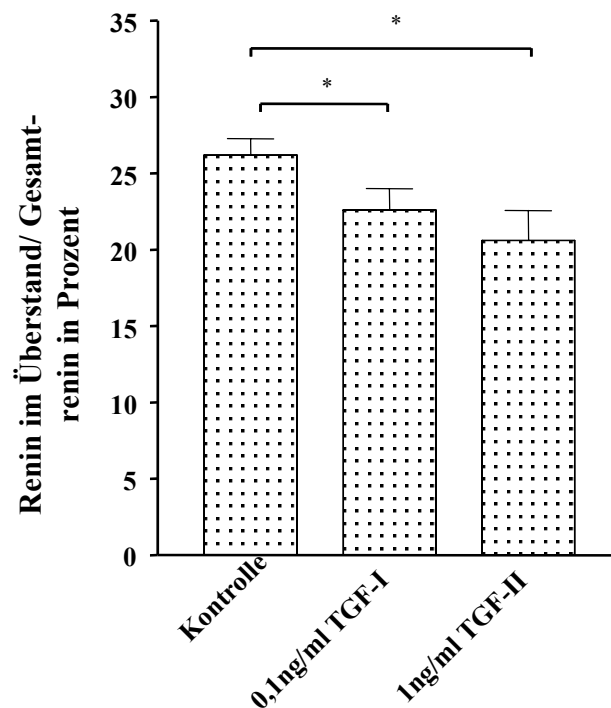


Abbildung 3.27: Reninsekretion in nativen isolierten JG- Zellen die für 24h mit 0,1ng/ ml TGF- β I und 1ng/ml TGF- β II inkubiert wurden Die Reninsekretion wurde aus dem Verhältnis von Renin im Medium zum Gesamtreniningehalt berechnet. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

3.3.3 Die Wirkung von TGF- β I und TGF- β II auf die Reningen-Expression

Angesichts der klaren Wirkung der beiden TGF- β Isoformen auf die Renin mRNA Abundanz versuchte ich den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus näher einzugrenzen. Insbesondere stellte sich die Frage ob TGF- β , welches bekanntlich gezielt in die Genregulation eingreift, die Transkriptionsaktivität des Reningenes beeinflusst. Hierzu wurden As4.1 Zellen zunächst transient mit einem 2.8 kb großem Reninpromotor-Luziferase- Konstrukt transfiziert (sh. 3.1.5) und anschliessend für 24 Stunden mit 0,1 ng/ml TGF- β I bzw. 1 ng/ml TGF- β II inkubiert. Beide TGF- β Isoformen reduzierten deutlich und in gleichem Ausmass die Aktivität des 2,8 kb Reningen-Promotors (Abbildung 3.28).

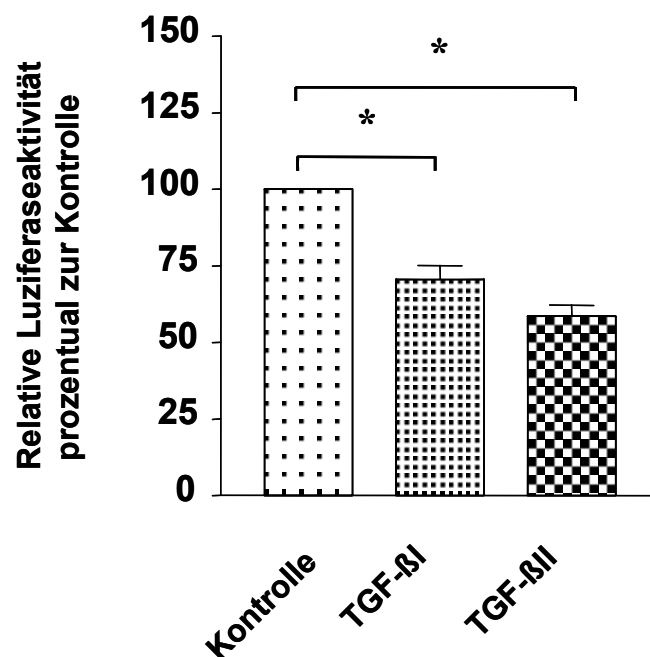


Abbildung 3.28: Einfluss von 0,1ng/ ml TGF- β I oder 1ng/ ml TGF- β II auf die Reninpromotoraktivität. As4.1 Zellen wurden mit einem Plamide transfiziert, welches ein 2,8kb Fragment des Renin 1^C Promotors enthielt. Die Luziferaseaktivität wurde, nachdem die Zellen für 24h mit 0,1ng/ ml TGF- β I oder 1ng/ ml TGF- β II behandelt wurden, bestimmt. Die Luziferaseaktivität ist als die Aktivität (RLU) der Luziferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der Renilla angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von vier Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

3.3.4 Interaktion zwischen TGF- β I/ TGF- β II und dem cAMP Signalweg

Nachdem der cAMP- Signalweg ein potenter Stimulator der Reninpromotor Aktivität und damit der Renin- Expression ist, stellte sich die Frage ob die hemmende Wirkung der beiden TGF- β Isoformen möglicherweise auf eine Beeinflussung des intrazellulären cAMP Signalweges zurückzuführen sein könnte. Um dies zu prüfen, wurde der cAMP Signalweg mit einer Kombination aus Adenylatzyklasestimulation (Forskolin) und Phosphodiesterasehemmung (IBMX) stark stimuliert und der Einfluss von TGF- β I bzw. TGF- β II auf die Renin mRNA Abundanz wurde anschliessend bestimmt. Dabei zeigte sich, dass auch die durch Forskolin/ IBMX hervorgerufene 7-fache Erhöhung der Renin mRNA Konzentration durch TGF- β I bzw. TGF- β II um etwa 50% abgeschwächt werden konnte, praktisch in dem gleichen Ausmass wie in Zellen ohne vorhergehende cAMP Stimulation (Abbildung 3.29).

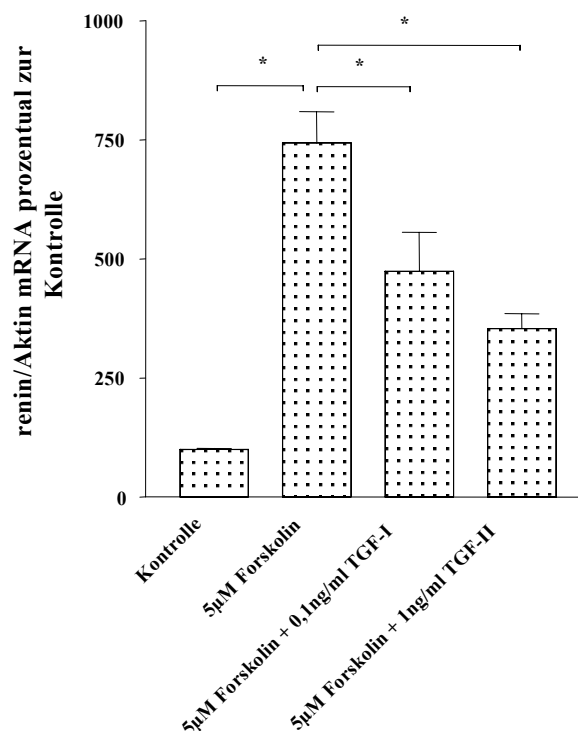


Abbildung 3.29: Renin mRNA Konzentration in nativen JG- Zellen, die für 24h 5µM Forskolin in der Kombination mit 0,1ng/ ml TGF- β I oder 1ng/ ml TGF- β II inkubiert wurden. Die RNA wurde isoliert und die Renin mRNA mittels Real- time PCR quantifiziert und auf die β -Aktin mRNA bezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 Die Wirkung von cAMP auf die Expression des Renings

In der vorliegenden Arbeit wurde der Signalübertragungsweg charakterisiert, über den cAMP die Expression des Renings in der renalen JG- Zelle erhöht. Dazu wurde die immortalisierte JG- Zelllinie As4.1 verwendet. Wie bereits von anderen Gruppen gezeigt wurde, reichte die alleinige Stimulation der Adenylatzyklase auch in meinen Experimenten nicht aus, um die Renin mRNA Expression zu beeinflussen (Jensen et al., 1998; Tamura et al., 2000). Ursächlich für die fehlende Wirkung der Aktivierung der Adenylatzyklase ist eine hohe Hintergrundaktivität der cAMP degradierenden Phosphodiesterasen. Entsprechend lies sich die cAMP Konzentration durch Aktivierung der Adenylatzyklase mit Forskolin allein nicht steigern. Erst durch eine gleichzeitige generelle Hemmung der Phosphodiesterasen wurde ein ca. 500 facher cAMP Anstieg erzeugt. Des weiteren lassen die erhaltenen Ergebnisse aus den Messungen der cAMP Konzentration in As4.1 Zellen, die mit Forskolin und einem selektiven Phosphodiesterasehemmer behandelt wurden, vermuten, dass dieser Effekt wahrscheinlich auf eine hohe Aktivität der cAMP- PDE- 3 und cAMP- PDE- 4 in As4.1- Zellen zurückzuführen ist (Abbildung 3.1). Da auch für JG- Zellen in situ eine hohe Aktivität der cAMP- PDE- 3 und cAMP- PDE- 4 diskutiert wurde, unterstützt diese Beobachtung die Annahme, dass die Zelllinie As4.1 ein gutes Modell zur Untersuchung von intrazellulären Signalwegen mit funktioneller Relevanz für die renalen JG- Zellen darstellt.

Durch Hemmung der PDE- Aktivität und gleichzeitiger Stimulation der Adenylatzyklase konnte reproduzierbar die Expression des Renings in As4.1 Zellen gesteigert werden. Vergleichbar zu Daten, die aus Versuchen mit JG- Zellen, ermittelt wurden, stieg die Renin mRNA Konzentration in As4.1 Zellen mit einer zeitlichen Verzögerung von 3-4 h an und erreichte ein Plateau nach circa 24 h (dellaBruna et al., 1993). Des weiteren konnte in As4.1 Zellen gezeigt werden, dass der cAMP vermittelten Anstieg der Renin mRNA Abundanz durch die Proteinkinase A vermittelt wird und mit einer Neusynthese von Prorenin einhergeht (Abbildungen 3.4, 3.5).

Die Erhöhung der Renin mRNA Konzentration in der As4.1 Zelle kann durch eine erhöhte Transkription des Renings oder durch eine Stabilisierung der Renin mRNA

ausgelöst werden. Einige Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass cAMP eine Erhöhung der Renin mRNA Konzentration durch einen verminderten Abbau der Renin mRNA vermittelt (Chen et al., 1993; Sinn et al., 1999). In As4.1 Zellen spielt die Stabilisierung der Renin mRNA für die Erhöhung der Renin mRNA Konzentration durch die Proteinkinase A eine untergeordnete Rolle. So konnte ich keine Unterschiede in der Halbwertszeit der Renin mRNA aus As4.1 Zellen, die über den cAMP-Signalweg stimuliert waren, gegenüber Renin mRNA aus unstimulierten As4.1 Zellen feststellen. Vielmehr gibt es überzeugende Hinweise, dass cAMP die transkriptionelle Aktivität des Reninpromotors in As4.1 Zellen erhöht. Die Aktivierung des Reninpromotors durch cAMP wurde schon früher beschrieben (Germain et al., 1997, Pan et al., 2001; Tamura et al., 2000; Ying et al., 1997). Ich konnte zeigen, dass dem Anstieg der cAMP Konzentration durch die Stimulation mit Forskolin und gleichzeitiger Hemmung der Phosphodiesterasen ein Anstieg der Transkription der Renin mRNA in der JG- Zelllinie As4.1 folgt. Dies ist vor allem dahingehend wichtig, als die transkriptionelle Regulation des Renins stark zellspezifisch ist. So ist z.B. in Dezidual Zellen die Transkription des Reningens sowohl durch cAMP als auch durch die Proteinkinase C Aktivität induzierbar und eine gleichzeitige Aktivierung der beiden Signalwege führt zu einer Potenzierung der Reningenexpression (Poisner et al., 1991). In JG- Zellen jedoch, wird die Reningenexpression durch die Aktivität der Proteinkinase C unterdrückt. Hierbei wirkt die Proteinkinase C Aktivität hemmend auf die Transkription des Reningens in JG- Zellen (Kurtz und Wagner, 1999; Müller et al., 2002).

In der Literatur werden unterschiedliche mögliche Mechanismen für die Aktivierung des Reninpromotors durch cAMP beschrieben. Diese Effekte der cAMP regulierten Reningentranskription konnte aber nur in Calu- 6 Lungenkarzinomzellen (Germain et al., 1997) und in Chorionzellen (Germain et al., 1996) gezeigt werden. So wurde im humanen Reninpromotor ein durch cAMP reguliertes DNA- Sequenzmotiv an der Stelle -226 bis -219 distal zur Transkriptionsstartstelle beschrieben. Diese DNA- Sequenz ist an der Regulation des Reningens durch cAMP beteiligt. Dabei muss sie mit dem cAMP responsive element (CRE)- bindenden Protein interagieren. Des weiteren ist für die optimale Aktivierung dieser CRE Sequenz in diesen beiden Zelllinien die Anwesenheit eines DNA Elements Voraussetzung, welches Homologien zu POU Domänen bindenden Transkriptionsfaktoren aufweist. Da aber Calu- 6 Zellen und Chorionzellen

z.B. keine endogene Renin mRNA Expression zeigen, unterscheiden sie sich von den renalen JG- Zellen wesentlich. Es ist deshalb nicht klar, ob die Stimulation des Reningens durch cAMP in JG- Zellen ebenfalls über CRE- Sequenz vermittelt wird.

Auch für die Regulation des murinen Reninpromotors wurden unterschiedliche Ergebnisse publiziert. Die Untersuchungen zur Promotorregulation wurden zum einen am Ren 1^C- Gen und zum anderen am Ren 1^D- Gen vergenommen. Beide Gene und auch deren Promotorsequenz sind sehr homolog zueinander und unterscheiden sich nur durch deren Expression in verschiedenen Mäusestämmen. Im Ren 1^C Gen wurde eine dem humanen Reninpromotor analoge Sequenz gefunden, die in die cAMP- abhängige Regulation des Reninpromotors durch das Retinoblastoma Protein (RB) involviert ist (Tamura et al.,1993). Wie jedoch die Studien am humanen Reninpromotor, wurden auch diese Versuche mit Zellen durchgeführt, die sich erheblich von den JG-Zellen unterscheiden.

Ein weiteres Element, das cAMP responsive element (CRE), welches bei der cAMP- abhängigen Regulation des Reninpromotors eine Rolle spielen könnte, wurde für die Position -625 bis -599 im murinen Ren1^D Gen beschrieben (Barrett et al., 1992; Horiuchi et al., 1993; Tamura et al., 2000; Tomita et al., 1999). Dieses CRE- Element wird von einem negativ regulierenden Element (NRE, -607 bis -589) überlappt. Deshalb ist für die Aktivierung der cAMP- abhängigen Reningentranskription zusätzlich der LXR Transkriptionsfaktor notwendig. Da dieser Transkriptionsfaktor den As4.1 Zellen endogen fehlt, findet die Regulation des Reninpromotors durch cAMP erst dann statt, wenn dieser Transkriptionsfaktor in die Zellen transfiziert wird (Tamura et al., 2000). Aufgrund dieses Befundes wurde außerdem von Tamura et al. (2000) geschlossen, dass das Fehlen des LXR Transkriptionsfaktors erklärt, weshalb in As4.1 Zellen die Renin mRNA Expression durch cAMP nicht stimulierbar ist. Wie jedoch bereits oben erwähnt, ist es durchaus möglich eine Erhöhung der Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen durch die Stimulation der Adenylatzyklase und gleichzeitiger Hemmung der PDEs zu erreichen ohne den LXR Transkriptionsfaktor zusätzlich transfizieren zu müssen. Außerdem kann aus meinen Befunden geschlossen werden, dass die Deletion des Bereichs von -625 bis -599 (Deletionskonstrukt 2,8kbΔ-1092 bis -536) keinen Einfluss auf die Stimulation der Reningentranskription durch cAMP hat (Abbildung 3.8).

Vielmehr zeigten meine Versuche, dass die Aktivierung des Reninpromotors durch cAMP im Bereich von -2866 bis -2625 von der Transkriptionsstartstellen, im

sogenannten Enhancerregion des Promotors, stattfindet. Dieser Bereich wurde als wichtige Sequenz für die zellspezifische Expression des Reningens beschrieben (Petrovic et al., 1996). Entsprechend senkte das Entfernen dieser Sequenz die Expression des Reningens in Reninpromotor- Reporterkonstrukten auf ein 1/1000stel gegenüber dem 2.8kb großen Reninpromotor. Die für die Aktivierung des Reninpromotors durch cAMP notwendig Sequenz konnte auf 50bp innerhalb dieser Enhancerregion eingeengt werden, was sich wiederum gut mit den Daten von Pan et al. (2001) und Shi et al. (2001) deckt. In As4.1 Zellen wurde außerdem die Expression des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP responsive element binding protein) gefunden, welcher eine wichtige Rolle in der über Proteinkinase A vermittelten cAMP- aktivierten Gentranskription spielt. Des weiteren wurde CREB in As4.1 Zellen durch Forskolin/ IBMX Proteinkinase A- spezifisch durch eine Phosphorylierung am Ser 133 aktiviert (Abbildung 3.9). Aufgrund dieser Befunde wurde eine Computer gestützte Suche nach möglichen CRE- Bindestellen in den auf 50bp eingeengten Bereich im der Enhancerregion des Reninpromotors durchgeführt, die drei mögliche Bindestellen für das CRE- bindende Protein ergab. Die Deletion von jeder dieser drei Stellen alleine hob die Stimulation mit Forskolin/ IBMX völlig auf, während die basale Aktivität des Reninpromotors, im Gegensatz zu den Befunden von Pan et al. (2001), durch die Deletion nicht beeinflusst wurde. Anhand eines Gelshiftassays konnte gezeigt werden, dass die Bildung eines DNA- Proteinkomplexes bei der Verwendung von doppelsträngigen Oligonukleotiden, welche die CRE- consensus Sequenz von -2698 bis -2691 enthielten, und eines Kernextraktes aus As4.1 Zellen, spezifisch für das CREB Protein ist. In einem darauffolgenden Supershiftassay konnte ich nachweisen, dass zu mindestens CREB-1 als wichtiger Cofaktor den DNA- Proteinkomplex mitbildet. In gleicher weise beschreibt Pan et al. (2001), dass CREB-1 und CREM an diese Stelle des Promotors binden können. Der Gelshiftassay, der mit den Oligonukleotiden durchgeführt wurde, welche die mutmaßliche CRE- Bindestelle von -2674 bis -2667 und die Stelle von -2657 bis -2650 enthielten, zeigten zwar einen DNA- Proteinkomplex, aber dieser war nicht spezifisch für das CREB Protein. Shi et al. (2001) legte mittels eines Gelshiftassays dar, dass der DNA- Proteinkomplex, welcher sich an der TGACCT Sequenz bildet, nicht durch CRE- consensus Oligonukleotide aufgelöst werden kann, obwohl die Sequenz sehr homolog zur klassischen CRE- consensus Sequenz ist. Die Stellen von -2674 bis -2667 und von -2657 bis -2650

enthalten genau dieses oben beschriebene Sequenzmotiv TGACCT. Des weiteren wurden die Stellen von -2674 bis -2667 und von -2657 bis -2650 auch als Bindestellen für RAR/ RXR Transkriptionsfaktoren gefunden, welche aber für die Reningentranskription als wichtig erachtet werden (Shi et al., 2001). Es ist daher anzunehmen, dass die mutmaßlichen CRE- Bindestellen von -2674 bis -2667 und von -2657 bis -2650 hauptsächlich von den RAR/ RXR Transkriptionsfaktoren benutzt werden (Pan et al., 2001). Anzumerken ist hier, dass Mitglieder der CREB/ ATF Transkriptionsfaktorenfamilie und Mitglieder der RAR/ RXR Transkriptionsfaktorenfamilie für ihre trans- wirkende Aktivierungsfunktion einen Interaktionspartnern benötigen und, dass beide Familien an CBP/ p300 binden können (DeCesare et al., 1999; Glass et al., 1997). Dadurch könnte der fehlende stimulatorische Effekt von Forskolin/ IBMX auf die Promotoraktivität in dieses Deletionskonstrukten auf eine Störung in der Ausbildung des Komplexes mit dem Coaktivator CBP/ p300 begründbar sein.

Zusammenfassend, legen die hier vorliegenden Ergebnisse dar, dass cAMP die Transkription des Reningens in der JG- Zelllinie As4.1 durch Phosphorylierung von CREB durch die Proteinkinase A und der nachfolgenden Interaktion des aktivierten CREB mit der CRE- consensus Sequenz von -2674 bis -2667 steigert. Die Sequenzen von -2674 bis -2667 und von -2657 bis -2650 spielen eine wichtige Rolle im cAMP vermittelten Signalübertragungsweg der Transkription des Reningens, jedoch nicht durch eine Interaktion mit dem CREB Protein.

4.2 Der direkte Einfluss von Aldosteron auf die Expression des Reningens und die Reninsekretion

Es sollte der direkte Einfluss von Aldosteron auf die Expression des Reningens und die Sekretion von Renin in JG- Zellen untersucht werden. Die Ergebnisse aus den dazu durchgeführten Versuchen legen nahe, dass Aldosteron durch einen direkten Einfluss auf die Stabilität der Renin mRNA die Renin mRNA Konzentration erhöht, jedoch keinen Einfluss auf die Exozytose von Renin aus den sekretorischen Vesikel der JG-Zellen ausübt.

Es wurde gefunden, dass JG- Zellen und As4.1 Zellen die mRNA des Mineralokortikoidrezeptor exprimieren, dass der Effekt von Aldosteron auf die Renin mRNA Konzentration durch Spironolacton, einem spezifischem Hemmer des Mineralokortikoidrezeptors, aufgehoben wird, und dass der Effekt auch durch andere Mineralokortikoide imitiert werden kann. Daraus kann geschlossen werden, dass Aldosteron in der JG- Zelle eine spezifische Wirkung über den Mineralokortikoidrezeptor ausübt. Die verzögerte Wirkung des Aldosterons deutet auf einen genomischen Effekt hin. Dieser Zeitverlauf entspricht anderen durch Aldosteron hervorgerufenen Langzeit- Effekten welche durch den Mineralokortikoidrezeptor vermittelt werden, wie z.B. die Auswirkungen von Aldosteron auf den Na^+/H^+ Austauscher in den Gefäßmuskelzellen (VSMC) (Ebata et al., 1999).

Meine Ergebnisse zeigen, dass der Anstieg des Renin mRNA Konzentration durch Aldosteron eher auf einer Stabilisierung der Renin mRNA beruht als auf einer Stimulation der Transkription des Reningens. Aldosteron stimulierte weder ein 4,2 kb noch ein 2,8 kb großes Fragment des Reninpromotors, welche jedoch durch Erhöhung der cAMP Konzentration gut stimulierbar waren. Überdies wurde die Abundanz der Renin mRNA in cAMP stimulierten Zellen durch Aldosteron weiter verstärkt ohne das die Aktivität des Reninpromotors weiter erhöht wurde. Es kann prinzipiell nicht ausgeschlossen werden, dass weiter vorgeschaltete regulatorische Einheiten einen transkriptionellen Einfluss durch Aldosteron auf den Renin mRNA Konzentration ausüben. Aber bis jetzt wurden außerhalb der 4,2 kb des Ren 1^C- Promotors noch keine weiteren regulatorischen Einheiten beschrieben. (Bader und Ganten, 2000).

Andererseits konnte in Gegenwart von Aldosteron eine deutliche Abnahme der Abbaurate der Renin mRNA gemessen werden. Die dreifach verlängerte Halbwertszeit

der Renin mRNA in Aldosteron behandelten Zellen stimmte mit der ungefähr dreifachen Erhöhung der Renin mRNA Konzentration durch Aldosteron gut überein.

Es ist schon seit längerem bekannt, dass Steroidhormone mRNA stabilisieren können (Pascall, 1997). Besonders für Sexualsteroiden wurde ein Einfluss auf die Halbwertszeit verschiedener Gene beschrieben (Hart und Davie, 1990; Lan et al 1999). Aber auch für Glukokortikoide sowie für Mineralokortikoide wurde bereits ein Einfluss auf die Stabilität der mRNA von verschiedenen Genen gefunden (Pascall, 1997). Für Glukokortikoide wurde beschrieben, dass sie z.B. die Stabilität der mRNA von Wachstumsfaktoren erhöhen (Peak and Axel, 1987) gleichzeitig aber auch die Stabilität der mRNA des Corticotropin- ausschüttenden Hormons erniedrigen (Ma et al., 2001). Aldosteron erhöht in Neuroblastomzellen die Cyclooxygenase- 1 mRNA durch Stabilisierung der Cyclooxygenase mRNA (Schneider et al., 2001). Die molekularen Vorgänge durch welche die mRNA mittels Aldosteron stabilisiert wird, sind bislang jedoch noch nicht bekannt.

Aus den durchgeführten Experimenten kann man außerdem schliessen, dass der cAMP Signalübertragungsweg an dem durch Aldosteron vermittelten Effekt nicht maßgeblich beteiligt ist. Selbst unter Bedingungen bei denen der cAMP Signalübertragungsweg maximal aktiviert wurde - durch eine Kombination aus direkter Stimulation der Adenylatzyklase mit Forskolin und einer Hemmung des cAMP Abbaus durch IBMX – konnte eine weitere Steigerung der Renin mRNA Abundanz durch Aldosteron gemessen werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass Aldosteron einen Faktor oder ein Enzym aktiviert, welcher wiederum die Renin mRNA stabilisiert.

Diese in vitro Befunde werfen die Frage nach der physiologischen Relevanz dieses Effekts auf. Meine Ergebnisse in As4.1 Zellen zeigen, dass der durch Aldosteron hervorgerufene Anstieg der Renin mRNA Konzentration sich auf den Renin-Proteingehalt der Zelle auswirkt. Die Annahme, dass Aldosteron einerseits über den Mineralokortikoidrezeptor stimulierend auf die Renin mRNA Abundanz wirkt, andererseits aber keinen direkten Einfluss auf die Reninsekretion ausübt, wird durch die Befunde aus Primärkulturen von murinen JG- Zellen unterstützt. Isolierte native JG-Zellen exprimieren ebenso wie As4.1 Zellen den Mineralokortikoidrezeptor und die Renin mRNA Konzentration ist durch Aldosteron ebenfalls induzierbar, während die Reninsekretion durch Aldosteron nicht stimulierbar ist. Die Stimulation der Renin mRNA Expression in den nativen JG- Zellen und in der Zelllinie As4.1 legte die

Vermutung nahe, dass wahrscheinlich auch in vivo die Renin mRNA durch Aldosteron stabilisiert wird. Um zu überprüfen, welchen direkten Einfluss Aldosteron in vivo auf die Reninsekretion hat, wurden mit Aldosteron Versuche an der isolierten perfundierten Niere durchgeführt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass Aldosteron keinen Einfluss auf die Reninsekretion ausübt und bestätigen damit die Daten, die in der primären JG- Zellkultur bei Messung der Reninsekretion erhalten wurden. Die isolierte perfundierte Niere ist aber aufgrund ihrer begrenzten Lebenszeit von 2-3h nicht als Modell für Reningenexpressionsstudien geeignet, da die Renin mRNA durch Aldosteron, wie meine Zellkulturversuche zeigen, erst nach 8h stimuliert wird. (Scholz und Kurtz, 1992). Es ist schwer, den direkten Einfluss von Aldosteron auf die Renin mRNA Abundanz in vivo nachzuweisen, da der Einfluss der systemischen Aldosteronwirkung, nämlich der inhibierende Effekt über den Salzhaushalt, das Extrazellulärvolumen und den Blutdruck auf das Reninsystem, ebenso die Reningenexpression beeinflusst, wie der direkte Effekt des Aldosterons über den Mineralokortikoidrezeptor (Hackenthal et al., 1990). Eine Möglichkeit den direkten Effekt auf die Reningenexpression zu zeigen, wäre eine Deletion des Mineralokortikoidrezeptors in der JG- Zelle.

Die physiologische Bedeutung der Stabilisierung der Renin mRNA durch Aldosteron könnte in der Abschwächung der auf die Reningenexpression wirkenden negativen Regulatoren sein. Wie die Abbildung 4.1 zeigt, wird die Genexpression des Renins durch das Renin- Angiotensin- Aldosteron System durch einige negative Rückkopplungsschleifen unterdrückt. Dazu gehören vor allem die direkte negative Rückkopplung auf die Expression der Renin mRNA durch Angiotensin II und eine indirekte negative Rückkopplung auf die Expression der Renin mRNA durch den Salzhaushalt, das Extrazellulärvolumen und den Blutdruck. Die Stabilisierung der Renin mRNA durch Aldosteron würde somit die Summe der inhibitorischen Einflüsse auf die Renin mRNA abpuffern. Der Effekt auf die Stabilität der Renin mRNA durch Aldosteron ist aber zweitrangig gegenüber der Regulation der Reningentranskription durch den Einfluss von Aldosteron über den Salzhaushalt und den Blutdruck. Aber es werden durch die stabilisierende Wirkung von Aldosteron auf die Renin mRNA, wie die gefundenen Ergebnisse zeigen, inhibitorische Effekte abgeschwächt und stimulatorische verstärkt.

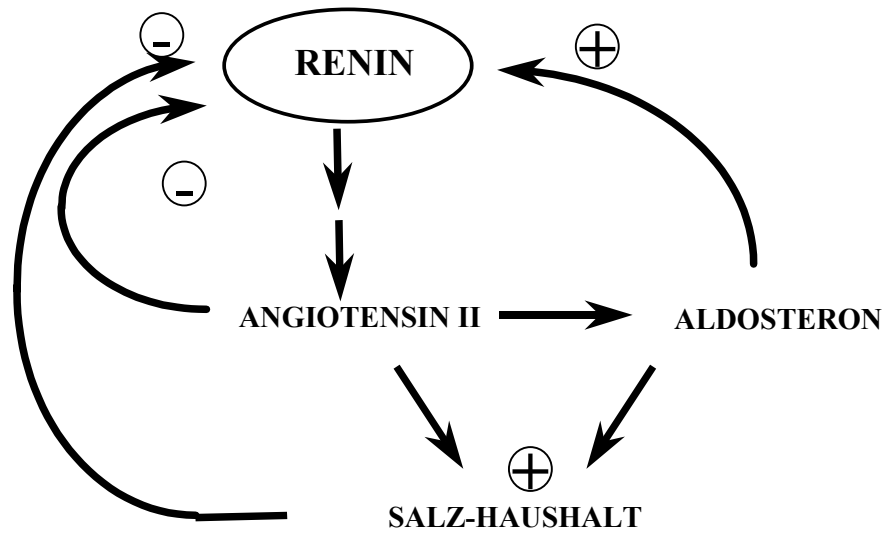


Abbildung 4.1: Graphisch dargestellt ist die Wirkung von Aldosteron auf die Reningenexpression.

4.3 Einfluss von TGF- β I und TGF- β II auf die Reningenexpression und Reninsekretion

Der Einfluss des transforming growth factor beta (TGF- β) auf die Entstehung und Ausbildung von Nierenerkrankungen wurde schon mehrfach beschrieben, aber der Wirkmechanismus konnte dabei noch nicht ausreichend erklärt werden (Kapadia et al., 1997; Yoskiaka et al., 1993; Isaka et al., 1993). An Rattennieren wurde eine immunhistologische Colokalisation des transforming growth factors- beta Rezeptors Typ 2 mit der reninproduzierenden JG- Zelle gezeigt (Liu und Ballermann, 1998). Dies deckt sich gut mit der mRNA Expression des transforming growth factors beta Rezeptors Typ 1 (TGF- β R1) und Typ2 (TGF- β R2) in der murinen nativen JG- Zelle und in der immortalisierten Zelllinie As4.1 (Abbildung 3.23). Des weiteren wurde in der Niere des Menschen und in der Mausniere TGF- β II in der Region des juxtaglomerulären Apparats beschrieben (Horikoshi et al., 1991; Ray et al., 1996). Da TGF- β ein autokrin und parakrin wirkender Faktor ist, ist es wichtig, dass die Expression des Rezeptors und die Expression von TGF- β in enger räumlicher Nachbarschaft stattfindet.

Die TGF- β II Expression ändert sich in der glomerulären Region unter Bedingungen, unter denen auch die Reninsekretion beeinflusst wird, wie z.B: eine niedrige Salzkonzentrationen im Blut (Horikoshi et al., 1991; Ray et al., 1996, Yamamoto et al., 1999). Außerdem wurde in heterozygoten TGF- β II knockout- Mäusen eine Steigerung der Renin mRNA Expression gegenüber den Wildtypen gezeigt. Daraus wurde gefolgert, dass TGF- β II möglicherweise die Renin mRNA Expression unterdrücken kann (Pietri et al., 2002). Meine Daten legen nahe, dass eine Senkung der Renin mRNA Abundanz sowohl in der Zelllinie As4.1 als auch in der nativen JG- Zelle durch TGF- β I und TGF- β II stattfindet. Der gefundene dosis-abhängige Effekt von TGF- β I (IC_{50} = 0,05 ng/ ml) und TGF- β II (IC_{50} = 0,5 ng/ ml) auf die Renin mRNA Konzentration ist mit in der Literatur beschriebenen wirksamen Konzentration in Zellkulturen vergleichbar (Hummer et al., 2003; Cao et al., 2001). Die gefundene Verringerung der Renin mRNA Abundanz um 50% in As4.1 Zellen durch TGF- β I und TGF- β II ist vergleichbar mit der Verringerung durch andere bekannte Hemmer der Reningenexpression wie z.B. Angiotensin II (Müller et al., 2002) oder TNF- α (Todorov et al., 2002). In nativen JG- Zellen wird die Renin mRNA Konzentration ebenfalls durch TGF- β I und TGF- β II

gesenkt. Dies lässt vermuten, dass die Wirkung von TGF- β I und TGF- β II auch in vivo die Reningenexpression inhibiert. Jedoch findet man bei den nativen isolierten JG-Zellen nur eine Reduktion der Renin mRNA Konzentration um 25% gegenüber der Kontrolle im Gegensatz zu 50% Reduzierung der Renin mRNA Abundanz in der As4.1 Zelllinie. Dieser verminderte Effekt von TGF- β I und TGF- β II in JG- Zellen ist aber nicht ungewöhnlich. So verringert Endothelin, ein bekannter und etablierter Hemmer der Reningenexpression, in der nativen isolierten JG- Zelle die Reningenexpression nur marginal gegenüber der Kontrolle, hemmt aber die cAMP- vermittelte Stimulation des Reningens (Kurtz et al., 1991). Auch für TGF- β I und TGF- β II konnte eine Abschwächung der cAMP- vermittelte Stimulation des Reningens gezeigt werden (Abbildung 3.29).

TGF- β I und TGF- β II vermindert der Renin mRNA Abundanz mit $t_{1/2} = 2.5$ h. Bei der Wirkung von Angiotensin II auf die Reningenexpression wird erst nach ca. 4h eine Senkung der Renin mRNA Konzentration messbar, die nach weiteren 12 h auf 50% gegenüber der Kontrolle sinkt (Müller et al., 2002). Obwohl in beiden Fällen, wie mit Reninpromotor- Reporterkonstrukten gezeigt, die Renin mRNA durch eine Hemmung der Transkription gesenkt wird. Eine Erklärung könnte ein anzunehmender unterschiedlicher Signaltransduktionsweg sein, wobei Angiotensin II seine Wirkung über die Aktivierung der PKC vermittelt (Müller et al., 2002), während für TGF- β I und TGF- β II sehr wahrscheinlich die Signalübertragung durch die Smad-Transkriptionsfaktoren vermittelt werden könnte. Wobei anzumerken ist, dass der intrazelluläre Signalweg für TGF- β I und TGF- β II in JG- Zellen noch nachgewiesen werden muss.

Die physiologische Bedeutung der Wirkung von TGF- β I und TGF- β II ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass TGF- β eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Niere spielt. So wird während der Nierenentwicklung eine Reduktion der reninproduzierenden Zellen beobachtet. Dabei exprimiert die reninproduzierende Zelle als einzige Zelle im gesamten Nierengewebe den Rezeptor für TGF- β Typ 2 (Liu und Ballermann, 1998). Da TGF- β I und TGF- β II die Reningenexpression hemmen können, wäre es vorstellbar, dass die Reduktion der reninproduzierenden Zellen während der Nierenentwicklung durch TGF- β I bzw. TGF- β II gesteuert wird.

In der adulten menschlichen Niere wird TGF- β eine Mediatorfunktion in der Ausbildung von menschlichen Nierenerkrankungen zu geschrieben. So wird z.B. eine

erhöhte Expression von TGF- β I bei der diabetischen Nephropathie des Menschen beobachtet (Yoskiaka et al., 1993). Eine erhöhte TGF- β Konzentration in der Niere induziert nicht nur eine vermehrte Produktion von Matrixproteinen, eine Hemmung von matrixabbauenden Proteasen und eine Chemotaxis von Makrophagen sondern übt auch direkten Einfluss auf Effektoren des RAAS, wie z.B: Angiotensin II oder auch Aldosteron aus (Border and Noble, 1995). Ein Mitwirken von TGF- β I bzw. TGF- β II an der Regulation des Renin- Angiotensin- Systems erscheint sehr wahrscheinlich. In der menschlichen Niere wird die TGF- β Produktion in der glomerulären Region durch Manöver gesteigert, die das Reninsystem stimulieren wie z.B. eine Volumenerniedrigung oder eine Restriktion der Kaliumkonzentration (Horiyoshi et al., 1992; Ray et al., 1993). Des weiteren wurde in der Rattenniere durch eine Hemmung des Angiotensin- converting Enzyms mit Enalapril sowohl eine Steigerung des Reninsystems als auch eine Steigerung der TGF- β Konzentration gemessen. TGF- β wiederum erhöht die Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskelzellen, und steigert die Aldosteronausschüttung (Noble und Border, 1997).

Die genauen physiologischen Wirkmechanismen, sowohl in der Nierenentwicklung, als auch bei der Ausbildung von Nierenerkrankungen müssen zukünftig noch näher charakterisiert werden.

5 Zusammenfassung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, den Signalweg der durch cAMP-vermittelten Stimulation der Reningenexpression näher zu charakterisieren. Die Versuche anderer Arbeitsgruppen zur Regulation des Reninpromotors durch cAMP ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Dies lag vor allem an der Verwendung von Zelllinien, die kein endogenes Renin exprimierten. Die Reningenexpression ist jedoch stark zellspezifisch. Deshalb habe ich die immortalisierte murine JG- Zelllinie As4.1 verwendet, die eine große funktionelle Ähnlichkeit zu den nativen JG- Zelle aufweist. Ich habe gefunden, dass die cAMP vermittelte Stimulierung der Reningenexpression vor allem auf einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität des Reninpromotors beruht. Eine Erhöhung der Renin mRNA Stabilität konnte für die cAMP- vermittelte Reningenexpression weitgehend ausgeschlossen werden. Die cAMP- Konzentration steigt in den As4.1 Zellen, wegen der hohen Phosphodiesteraseaktivität, vor allem der Phosphodiesterase Isoformen 3 und 4, erst nach einer Hemmung der Phosphodiesterasen und einer gleichzeitigen Aktivierung der Adenylatzyklen an. Die anschließende Aktivierung der Proteinkinase A durch cAMP und des cAMP responsive element binding proteins (CREB) durch die Proteinkinase A ist für eine gesteigerte Reningentranskription unerlässlich. Durch die Konstruktion von Reninpromotor-Reporterkonstrukten konnte ich zeigen, dass die Regulation der Transkription des Reningens durch drei in der Enhancerregion des Reninpromotors befindliche cAMP responsive elements (CRE, -2698 bis -2695, -2675 bis -2671 und -2654 bis -2651) erfolgt. Für die CRE- Stelle von -2698 bis -2695 konnte eine spezifische Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor CREB- 1 nachgewiesen werden. Die Erhöhung der Reningentranskription hat ebenfalls eine Steigerung des intrazellulären Reningehaltes zu Folge.

Aldosteron übt bekanntermaßen über das Extrazellulärvolumen und den Blutdruck einen hemmenden Effekt auf das Reninsystem aus. Eine mögliche direkte Regulation der Reningenexpression und Reninsekretion durch Aldosteron, vergleichbar zur negativen Rückkopplung von Angiotensin II, war jedoch noch nicht geklärt. Die vorliegende Arbeit zeigt einen direkten stimulatorischen Einfluss von Aldosteron (100nM) auf die Reningenexpression, der über den Mineralokortikoidrezeptor der JG-

Zelle vermittelt wird. Aldosteron erhöht dabei die mRNA Konzentration durch eine Stabilisierung der Renin mRNA. Die Renin mRNA Halbwertszeit in As4.1 Zellen wird von $t_{1/2} = 10\text{h}$ auf $t_{1/2} = 38\text{h}$ erhöht, was eine Erhöhung der Renin mRNA Abundanz mit einer Latenzzeit von ca. 8h auf das 2,5 fache der Kontrolle nach 24h zu folge hat. Eine Erhöhung der Reninpromotoraktivität durch Aldosteron konnte für ein 4.2kb großes Reninpromotorfragment ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zur Reningenexpression bleibt die Reninsekretion durch die direkte Wirkung von Aldosteron über den Mineralokortikoidrezeptor unbeeinflusst.

TGF- β I und TGF- β II wird schon seit längerem eine pathophysiologische Rolle in der Entwicklung und Ausbildung einer Reihe von Nierenerkrankungen zugeschrieben. Auffällig ist vor allem die Expression von TGF- β I und TGF- β II in der glomerulären Region und die Expression der TGF- β Rezeptoren nahezu ausschliesslich in den JG-Zellen.

Ich konnte zeigen, dass TGF- β I und TGF- β II hemmend auf die Reningenexpression und Reninsekretion wirken. So senkt TGF- β I ($IC_{50} = 0,05\text{ng/ml}$) und TGF- β II ($IC_{50} = 0,5\text{ng/ml}$) sowohl in As4.1 Zellen wie auch in isolierten nativen JG- Zellen die Renin mRNA Expression. Ebenso wird die durch cAMP hervorgerufene gesteigerte Renin mRNA Expression durch TGF- β abgeschwächt. Die Hemmung der Reningenexpression beruht auf einer verminderten Reningentranskription, wobei sich die regulatorische Sequenz hierfür in den ersten 2,8 kb des Reninpromotors befinden. Die physiologische Relevanz dieser Befunde ist noch unklar und muss in zukünftigen Versuchen näher charakterisiert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E** (1996) Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 50(1):148-55
- Attisano L, Wrana JL** (1998) Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 10(2):188-94
- Bader M, Ganten D.** Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med.* 78(3):130-9, 2000
- Bader M, Kang N, Walther T, Fukamizu A, Murakami K, Ganten D** (1996) Phenotypic rescue of angiotensinogen-knock-out mice by tissue-specific expression of a rat angiotensinogen transgene (abstract). *Hypertension* 28:708
- Bader M, Wagner J, Lee M, Ganten D** (1994) The role of the renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Hypertens Res* 17:1-16
- Barajas L** (1979). Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol* 236, 240-246.
- Barrett G, Horiuchi M, Paul M, Pratt RE, Nakamura N, Dzau VJ.**(1992) Identification of a negative regulatory element involved in tissue-specific expression of mouse renin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 885-9.
- Barrett GL, Horiuchi M, Paul M, Nakamura N, Pratt RE, Dzau VJ** (1992) Identification of a negative element involved in tissue specific expression of mouse renin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:885-889
- Border WA and Noble NA** (1995) TGF- β *Sci Am Sci Med.* 2: 68-77
- Border WA, Noble NA** (1995) Targeting TGF-beta for treatment of disease. *Nat Med.* 1(10):1000-1.
- Borensztein P, Germain S, Fuchs S, Philippe J, Corvol P, Pinet F** (1994) *Cis*-regulatory elements and *trans*-acting factors directing basal and cAMP-stimulated human renin gene expression in chorionic cells. *Circ Res* 74:764-773
- Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S** (1995) Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. *Am J Physiol.* 269, F793-805.

- Buhrle C P, Nobiling R, and Taugner R** (1985). Intracellular recordings from renin-positive cells of the afferent glomerular arteriole. *Am. J. Physiol* 249, 272-281
- Campbell DJ** (1987) Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 79:1-6
- Campbell DJ**, (1996) Endogenous angiotensin II levels and the mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor type 1 antagonists. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 3 (suppl): S125-131
- Cao Y, Wie H, Da B, Huang Y** (2001) Effect of transforming growth factor-beta 2 on phagocytosis in cultured bovine trabecular meshwork cells. *J Tongji Med Univ.*21(4):318-320
- Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ** (1997) Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100:1566-1574
- Catanzaro DF, Mullins JJ, Morris BJ** (1983). The biosynthetic pathway of renin in mouse submaxillary gland. *J Biol. Chem* 258, 7364-7368
- Chen M, Schnermann J, Smart AM, Brosius FC, Killen PD, Briggs JP** (1993) Cyclic AMP selectively increases renin mRNA stability in cultured juxtaglomerular granular cells. *J Biol Chem* 268:24138-24144
- Chiu T, Reid IA** (1996) Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 278:793-799
- Chomczynski P, Sacchi N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159
- Churchill PC, and Churchill MC** (1983). Effects of trifluoperazine on renin secretion of rat kidney slices. *J. Pharmac. Exp. Ther* 224, 68-72
- Clark AF, Sharp MGF, Morley SD, Fleming S, Peters J, Mullins JJ** (1997) Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol Chem* 272:18185-18190
- DeCesare D, Fimia GM, Sassone-Corsi P.** (1999) Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends Biochem Sci.* J 24: 281-5.
- della Bruna R, Kurtz A, Corvol P, Pinet F** (1993) Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells. Short-term effects of cAMP on renin mRNA and secretion. *Circ Res* 73:639-648

- della Bruna R, Kurtz A, Schriker K** (1996) Regulation of renin synthesis in the juxtaglomerular cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5:16-19
- Della Bruna R, Pinet F, Corvol P and Kurtz A** (1992). Calmodulin antagonists stimulate renin secretion and inhibit renin synthesis *in vitro*. *Am. J. Physiol* 262, 397-402
- Drynck R, Akhurst J, Balmain A** (2001). TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet.* 29, 117-129
- Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE** (1988). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 255, F563-573
- Ebata S, Muto S, Okada K, Nemoto J, Amemiya M, Saito T, Asano Y.** (1999) Aldosterone activates Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney International* 56:1400-1412,
- Fray JCS, Lush DJ** (1976) Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney. *Am J. Physiol* 231, 936-944
- Fukamizu A, Seo MS, Hatae T, Yokoyama M, Nomura T, Katsuki M, Murakami K** (1989) Tissue-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 165:826-832
- Fuller PJ, Lim- Tio SS and Brennan FE** (2000) Specificity in mineralocorticoid versus glucocorticoid action. *Kidney Int* 57: 1256- 1264
- Germain S, Bonnet F, Fuchs S, Philippe J, Corvol P, Pinet F** (1999) Dissection of silencer elements in first intron controlling the human renin gene. *J Hypertens* 17:899-905
- Germain S, Bonnet F, Philippe J, Fuchs S, Corvol P, Pinet F** (1998) A novel distal enhancer confers chorionic expression on the human renin gene. *J Biol Chem* 273:25292-25300
- Germain S, Konoshita T, Fuchs S, Philippe J, Corvol P, Pinet F** (1997) Regulation of human renin gene transcription by cAMP. *Clin Exp Hypertens* 19:543-550
- Germain S, Konoshita T, Philippe J, Corvol P, Pinet F** (1996) Transcriptional induction of the human renin gene by cyclic AMP requires cyclic AMP response element-binding protein (CREB) and a factor binding a pituitary-specific trans-acting factor (Pit-1) motif. *Biochem J* 316:107-113

- Germain S, Philippe J, Fuchs S, Lengronne A, Corvol P, Pinet F** (1997) Regulation of human renin secretion and gene transcription in Calu-6 cells. *FEBS Lett* 407:177-183
- Gilbert MT, Sun J, Yan Y, Oddoux C, Lazarus A, Tansey WP, Lavin TN, Catanzaro DF** (1994) Renin gene promoter activity in GC cells is regulated by cAMP and thyroid hormone through Pit-1-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 269:28049-28054
- Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG.** (1997) Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 222-32.
- Goormaghtigh N** (1937) L'appareil neuromyo-arteriel juxtaglomerulaire du rein; ses reactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifere. *C R Soc Biol* 124:293-296
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R** (1990) Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70:1067-1116
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD** (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94:2504-2510
- Hart LL, Davie JR.** (2002) The estrogen receptor: more than the average transcription factor. *Biochem Cell Biol.* 80(3): 335-41,
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P** (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465–471,
- Hirose S, Kim S, Miyazaki H, Park YS, Murakami K** (1985) In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. *J. Biol Chem* 260, 16400-16405
- Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Kramer BK, Riegger GA, Kurtz A** (1997) Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15:1471-1479
- Horikoshi S, McCune BK, Gomez RA, Horikoshi S, Kopp JB, Klotman PE** (1991) Water deprivation stimulates transforming growth factor- β_2 accumulation in the juxtaglomerular apparatus of mouse kidney. *J Clin Invest* 88:2117-2122
- Horiuchi M, Nakamura N, Tang S-S, Barrett G, Dzau VJ** (1991) Molecular mechanism of tissue-specific regulation of mouse renin gene expression by cAMP. Identification of an inhibitory protein that binds nuclear transcriptional factor. *J Biol Chem* 266:16247-16254

- Horiuchi M, Pratt RE, Nakamura N, Dzau VJ** (1993) Distinct nuclear proteins competing for an overlapping sequence of cAMP and negative-regulatory elements regulate tissue-specific mouse renin gene expression. *J Clin Invest* 92:1805-1811
- Hummer BT, Bartlett C, Henry E, Weissman BE** (2003) Expression of Smad4 in the FaDu cell line partially restores TGF-beta growth inhibition but is not sufficient to regulate fibronectin expression or suppress tumorigenicity. *J Cell Physiol.* Mar;194(3): 289-302
- Isaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, Kaneda Y, Kamada T, Imai E** (1993): Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- β or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. *J Clin Invest* 92: 2597–2601
- Jacob HJ, Sigmund CD, Shockley TR, Gross KW, Dzau VJ** (1991) Renin promoter SV40 T-antigen transgenic mouse. *Hypertension* 17:1167-1172
- Jensen BL, and Skott O** (1993). Osmotically sensitive renin release from permeabilized juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol* 265, 87-95
- Jensen BL, and Skott O** (1994). Renin release from permeabilized juxtaglomerular cells is stimulated by chloride but not by low calcium. *Am. J. Physiol* 266, 604-611.
- Jensen BL, and Skott O** (1996). Blockade of chloride channels by DIDS stimulates renin release and inhibits contraction of afferent arterioles. *Am. J. Physiol* 270, 718-727
- Jensen BL, Kramer BK, and Kurtz A** (1997). Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29, 1148-1155
- Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A** (1997) Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29:1148-1155
- Jones CA, Petrovic N, Novak EK, Swank RT, Sigmund CD, Gross KW** (1997) Biosynthesis of renin in mouse kidney tumor As4.1 cells. *Eur J Biochem* 243:181-190
- Jutras I, Reudelhuber TL** (1999) Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett* 443:48-52
- Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE and Mann DL** (1997) Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor gene and protein in adult feline myocardium *Circ Res* 81: 187-195
- Keeton TK, Campbell WB** (1976) The effects of altered sodium balance and adrenergic blockade on renin release induced in rats by angiotensin antagonism *Circ Res* 38, 531-539

- Kikkawa Y, Yamanaka N, Tada J, Kanamori N, Tsumura K, Hosoi K** (1998) Prorenin processing and restricted endoproteolysis by mouse tissue kallikrein family enzymes (mK1, mK9, mK13, and mK22). *Biochim Biophys Acta* 1382:55-64
- King JA, and Fray JC** (1994). Hydrogen and potassium regulation of (pro)renin processing and secretion. *Am. J. Physiol* 267, 1-12
- Kon Y, Endoh D** (1999) Renin in exocrine glands of different mouse strains. *Anat Histol Embryol* 28:239-242
- Kreigstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K** (2002) TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J Physiol Paris*. 96(1-2):25-30.
- Kurtz A** (1989). Cellular control of renin secretion. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmac* 113, 2-40
- Kurtz A and Penner R** (1989). Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3423-3427
- Kurtz A, della Bruna RD**. Determinants of renin secretion and renin synthesis in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int Suppl.* 32:S13-5, 1991
- Kurtz A, Götz KH, Hamann M, and Wagner C** (1998). Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4743-4747
- Kurtz A, Gotz KH, Hamann M, Wagner C** (1998) Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4743-4747
- Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhrle C, Nobiling R, Taugner R, Hackenthal R, and Bauer C** (1986). Role of protein kinase C in the inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am. J. Physiol* 250, 563-571
- Kurtz A, Wagner C** (1998) Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275:F849-F862
- Kurtz A, Wagner C** (1999) Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol* 202:219-225
- Kurtz A, Wagner C** (1999) Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10:S162-S168
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Laframboise M, Reudelhuber TL, Jutras I, Brechler V, Seidah NG, Day R, Gross KW, Deschepper CF** (1997) Prorenin activation and prohormone convertases in the mouse As4.1 cell line. *Kidney Int* 51:104-109
- Lan L, Vinci JM, Melendez JA, Jeffrey JJ, Wilcox BD** (1999) Progesterone mediates decreases in uterine smooth muscle cell interleukin-1 α by a mechanism involving decreased stability of IL-1 α mRNA. *Mol Cell Endocrinol.* 155(1-2):123-33.
- Lang JA, Ying L-H, Morris BJ, Sigmund CD** (1996) Transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human renin gene expression in Calu-6 cells. *Am J Physiol* 271:F94-F100
- Lifton RP, Gharavi AG, und Geller DS** (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545- 556
- Liu A, Ballermann BJ** (1998) TGF- β type II receptor in rat renal vascular development: Localisation to juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 53, 716-725
- Loutzenhiser R, Chilton L and Trottier G** (1997) Membrane potential measurements in renal afferent arterioles: action of angiotensin II. *Am J Physiol* 273, F307-314
- Ma XM, Camacho C, Aguilera G.** Regulation of corticotropin-releasing hormone (CRH) transcription and CRH mRNA stability by glucocorticoids. *Cell Mol Neurobiol.* 21(5):465-75. 2001
- MacKay K, Kondaiah P, Danielpour D Austin HA, Brown PD** (1990) Expression of transforming growth factor-beta 1 and beta 2 in rat glomeruli. *Kidney Int*;38(6):1095-100.
- MacLellan WR, Brand T, Schneider MD** (1993) Transforming growth factor-beta in cardiac ontogeny and adaptation. *Circ Res.* Nov;73(5):783-91
- Massague J, Blain SW, Lo RS** (2000) TGF- β signaling in growth control, cancer , and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309
- Massague J, Chen Y-E** (2000) Controlling TGF- β signaling. *Genes Devel* 14: 627–644
- Miyazono K, ten Dijke P, Heldin CH** (2000) TGF- β signaling by Smad proteins. *Adv. Immunol.* 75, 115-157
- Morris BJ** (1992) Molecular biology of renin I: gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10:209-214
- Morris BJ** (1992) Molecular biology of renin II: gene control by messenger RNA, transfection and transgenic studies. *J Hypertens* 10:337-342

- Morris BJ** (1996) Molecular biology of renin. In: Lindpaintner K, Ganten D (eds) Molecular reviews in cardiovascular medicine. Chapman & Hall, London, pp 12-32
- Muller MW, Todorov V, Kramer BK, Kurtz A** (2002) Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch.* 444(4):499-505.
- Mullins JJ, Sigmund CD, Kane-Haas C, McGowan RA, Gross KW** (1989) Expression of the DBA/2 J Ren-2 gene in the adrenal gland of transgenic mice. *EMBO J* 8:4065-4072
- Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W** (1992) Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42:1017-1019
- Noble NA, Border WA** (1997) Angiotensin II in renal fibrosis: should TGF-beta rather than blood pressure be the therapeutic target? *Semin Nephrol* Sep;17(5):455-66.
- Ogawa K, Yamasato M, and Taniguchi K** (1995). Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of kidneys. *Anat. Rec* 243, 336- 346
- Paek I, Axel R.** Glucocorticoids enhance stability of human growth hormone mRNA. *Mol Cell Biol.* 7(4):1496-507. 1987
- Pan L, Black TA, Shi Q, Jones CA, Petrovic N, Loudon J, Kane C, Sigmund CD, Gross KW.** Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J Biol Chem.* 276:45530-45538. 2001
- Panthier JJ, Foote S, Chambroud B, Strosber AD, Corvol P, Rougen F** (1982). Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298, 90-92
- Park CS, Chang SH, Lee HS, Kim SH, Chang JW, Hong CD** (1996) Inhibition of renin secretion by Ca^{2+} through activation of myosin light chain kinase. *Am J Physiol* 271:C242-C247
- Park CS, Lee HS, Chang SH, Honeyman TW, Hong CD** (1996) Inhibitory effect of Ca^{2+} on renin secretion elicited by chemiosmotic stimuli through actomyosin mediation. *Am J Physiol* 271:C248-C254
- Pascall JC.** Post-transcriptional regulation of gene expression by androgens: recent observations from the epidermal growth factor gene. *J Mol Endocrinol.* 18(3):177-180, 1997
- Paul M, Bachmann J, Ganten D** (1992) The tissue renin-angiotensin systems in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2:94-99

- Paul M, Ganten D** (1992) The molecular basis of cardiovascular hypertrophy: the role of the renin angiotensin system. *J Cardiovasc Pharmacol* 19 [Suppl 5]:S51-S58
- Petrovic N, Black TA, Fabian JR, Kane C, Jones CA, Loudon JA, Abonia JP, Sigmund CD, Gross KW** (1996) Role of proximal promoter elements in regulation of renin gene transcription. *J Biol Chem* 271:22499-22505
- Petrovic N, Kane CM, Sigmund CD, Gross KW** (1997) Downregulation of renin gene expression by interleukin-1. *Hypertension* 30:230-235
- Pfeilschifter J, Kurtz A, Bauer C** (1985). Inhibition of renin release by platelet activating factor in cultured rat juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 127, 903-910
- Phillips MI, Speakman EA, Kimura B** (1993) Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 43:1-20
- Piek E, Heldin C-H, ten Dijke P** (1999): Specificity, diversity and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J* 13: 2105–2124
- Pietri L, Bloch-Faure M, Belair MF, Sanford LP, Doetschman T, Menard J, Bruneval P, Meneton P** (2002) Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the TGF-beta(2) gene. *Exp Nephrol.* 10(5-6):374-382.
- Pinet F, Mizrahi J, Menard J, Corvol P.** (1986) Role of cyclic AMP in renin secretion by human transfected juxtaglomerular cells. *J Hypertens Suppl.* 4: S421-423
- Poisner AM, Thraillkill K, Poisner R, Handwerger S.**(1991) Cyclic AMP as a second messenger for prorenin release from human decidual cells. *Placenta.* 12: 263-267
- Ray PE, McCune BK, Geary KM, Carey RM, Klotman PE, Gomez RA** (1993) Modulation of renin release and renal vascular smooth muscle cell contractility. *Kidney Int* 44, 1006-1013
- Reid IA and Chiu YJ** (1995). Nitric oxide and the control of renin secretion. *Fund. Clin. Pharmac* 9, 309-323
- Ritthaler T, Della Bruna R, Krämer BK, and Kurtz A** (1996). Endothelins inhibit cyclic-AMP induced renin gene expression in cultured mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 50, 108-115
- Ritthaler T, Scholz H, Ackermann M, Riegger GAJ, Kurtz A, and Krämer BK** (1995). Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol* 268, 39-45

- Roberts RA, James NH, Cosulich SC** (2000). The role of protein kinase B and mitogen-activated protein kinase in epidermal growth factor and tumor necrosis factor alpha-mediated rat hepatocyte survival and apoptosis. *Hepatology*. 2000 Feb;31(2):420-427
- Romero JC, Lahera V, Salom MG and Biondi ML** (1992). Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J. Am. Soc. Nephrol* **2**, 1371-1387
- Schneider N, Lanz S, Ramer R, Schaefer D, Goppelt-Strube M**. Up-regulation of cyclooxygenase-1 in neuroblastoma cell lines by retinoic acid and corticosteroids. *Neurochem*. 77(2):416-24. 2001
- Schnermann J** (1998) Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol* 274:R263-R279
- Schnermann JB, Traynor T, Yang T, Huang YG, Oliverio MI, Coffman T, Briggs JP** (1997) Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 273:F315-F320
- Scholz H and Kurtz A** (1992) Disparate effects of calcium channel blockers on pressure dependence of renin secretion and flow in the isolated perfused rat kidney. *Pflugers-Arch*. 421: 155-162,
- Scholz H, Hamann M, Götz KH, and Kurtz A** (1994). Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflugers Arch* 428, 173-178.
- Schricker K, and Kurtz A** (1993). Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol* 265, 180-185
- Schricker K, Della Bruna R, and Kurtz A** (1993). Extracellular calcium exerts a dual effect on renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* 423, 14-20
- Schricker K, Holmer S, Kramer BK, Riegger GA, Kurtz A** (1997) The role of angiotensin II in the feedback control of renin gene expression. *Pflugers Arch* 434:166-172
- Schricker K, Kurtz A** (1996). Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake. *Pflügers Arch* 432, 187-191
- Schwertschlag U, and Hackenthal E** (1983). Trifluoperazine antagonizes inhibition of renin release by angiotensin II. *Clin. Exp. Pharmac. Physiol* **10**, 605-608

- Sharp MG, Fettes D, Brooker G, Clark AF, Peters J, Fleming S, Mullins JJ** (1996) Targeted inactivation of the Ren-2 gene in mice. *Hypertension* 28:1126-1131
- Shaywitz AJ, Greenberg ME.** (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem.* 68: 821-861
- Shi Q, Black TA, Gross KW, Sigmund CD** (1999) Species-specific differences in positive and negative regulatory elements in the renin gene enhancer. *Circ Res* 85:479-488
- Shi Q, Gross KW, Sigmund CD.** (2001) Retinoic acid-mediated activation of the mouse renin enhancer. *J Biol Chem.* 276: 3597-3603
- Sigmund CD, Fabian JR, Gross KW** (1992) Expression and regulation of the renin gene. *Trends Cardiovasc Med* 2:237-245
- Sigmund CD, Gross KW** (1991) Structure, expression, and regulation of the murine renin genes. *Hypertension* 18:446-457
- Sigmund CD, Jones CA, Fabian JR, Mullins JJ, Gross KW** (1990) Tissue and cell specific expression of a renin promoter-reporter gene construct in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 170:344-350
- Sigmund CD, Jones CA, Kane CM, Wu C, Lang JA, Gross KW** (1992) Regulated tissue- and cell-specific expression of the human renin gene in transgenic mice. *Circ Res* 70:1070-1079
- Sigmund CD, Okuyama K, Ingelfinger J, Jones CA, Mullins JJ, Kane C, Kim U, Wu C, Kenny L, Rustum Y, Dzau VJ, Gross KW** (1990) Isolation and characterization of renin-expression cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J Biol Chem* 265:19916-19922
- Sinn PL, Davis DR, Sigmund CD** (1999) Highly regulated cell type-restricted expression of human renin in mice containing 140-or 160-kilobase pair P1 phage artificial chromosome transgenes. *J Biol Chem* 274:35785-35793
- Sinn PL, Sigmund CD** (1999) Human renin mRNA stability is increased in response to cAMP in Calu-6 cells. *Hypertension* 33:900-905
- Sinn PL, Zhang X, Sigmund CD** (1999) JG cell expression and partial regulation of a human renin genomic transgene driven by a minimal renin promoter. *Am J Physiol* 277:F634-F642
- Skott O** (1986). Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflugers Arch* **407**, 41-45.

- Skott O** (1988). Do osmotic forces play a role in renin secretion?. *Am. J. Physiol* 255, 1-10
- Skott O, and Taugner R** (1987). Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epithelioid cell granules. *Cell Tissue Res* 249, 325-329
- Skott O, Briggs JP** (1987) Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion. *Science* 237:1618-1620
- Skott, O. and Jensen, B. L** (1992). Involvement of chloride in renin secretion from isolated rat glomeruli. *Am. J. Physiol* 262, 403-410
- Smith DL, Morris BJ** (1991) Transient expression analyses of DNA extending 2.4 kb upstream of the human renin gene. *Mol Cell Endocrinol* 80:139-146
- Sola C, Tronik D, Dreyfus M, Babinet C, Rougeon F** (1989) Renin-promoter SV40 large T-antigen transgenes induce tumors irrespective of normal cellular expression of renin genes. *Oncogene Res* 5:149-153
- Spindler B, Mastroberardion L, Custer M and Verrey F** (1997) Characterisation of early aldosterone- induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Arch* 434: 323-331
- Stockand JD** (2002) New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am J Physiol Renal* 282: F559- F576
- Sun J, Oddoux C, Gilbert MT, Yan Y, Lazarus A, Campbell WG, Catanzaro DF** (1994) Pituitary specific transcription factor (Pit-1) binding site in the human renin gene 5'-flanking DNA stimulates promoter activity in placental cell primary cultures and pituitary lactosomatotropic cell lines. *Circ Res* 75:624-629
- Sun J, Oddoux C, Lazarus A, Gilbert MT, Catanzaro DF** (1993) Promoter activity of human renin 5'-flanking DNA sequences is activated by the pituitary-specific transcription factor Pit-1. *J Biol Chem* 268:1505-1508
- Tamura K, Chen YE, Horiuchi M, Chen Q, Daviet L, Yang Z, Lopez-Illasaca M, Mu H, Pratt RE, Dzau VJ.** (2000) LXRA functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 8513-8518
- Tamura K, Tanimoto K, Murakami K, Fukamizu A** (1993) A combination of upstream and proximal elements is required for efficient expression of the mouse renin promoter in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 20:3617-3623

- Tamura K, Tanimoto K, Murakami K, Fukamizu A** (1993) Activation of mouse renin promoter by cAMP and c-Jun in a kidney-derived cell line. *Biochim Biophys Acta* 1172:306-310
- Tamura K, Tanimoto K, Murakami K, Fukamizu A.** (1992) A combination of upstream and proximal elements is required for efficient expression of the mouse renin promoter in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 20: 3617-3623
- Tamura K, Umemura S, Fukamizu A, Ishii M, Murakami K** (1995) Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. *Hypertens Res* 18:7-18
- Tamura K, Umemura S, Nyui N, Yabana M, Toya Y, Fukamizu A, Murakami K, Ishii M** (1998) Possible role of c-Jun in transcription of the mouse renin gene. *Kidney Int* 54:382-393
- Tamura K, Umemura S, Nyui N, Yamaguchi S, Ishigami T, Hibi K, Yabana M, Kihara M, Fukamizu A, Murakami K, Ishii M** (1997) A novel proximal element mediates the regulation of mouse Ren-1C promoter by retinoblastoma protein in cultured cells. *J Biol Chem* 272:16845-16851
- Tamura K, Umemura S, Yamaguchi S, Iwamoto T, Kobayashi S, Fukamizu A, Murakami K, Ishii M** (1994) Mechanism of cAMP regulation of renin gene transcription by proximal promoter. *J Clin Invest* 94:1959-1967
- Tanimoto K, Sugiyama F, Goto Y, Ishida J, Takimoto E, Yagami K, Fukamizu A, Murakami K** (1994) Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J Biol Chem* 269:31334-31337
- Taugner R, Buhle CP and Nobiling R** (1984). Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res* 237, 459-472
- Taugner R, Buhle CP, Hackenthal E, Mannek E, and Nobiling R** (1984). Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr. Nephrol* 43, 76-101.
- Thompson MW, Smith SB, Sigmund CD** (1996) Regulation of human renin mRNA expression and protein release in transgenic mice. *Hypertension* 28:290-296
- Tillmann-Bogush M, Heaton JH, Gelehrter TD** (1999) Cyclic nucleotide regulation of PAI-1 mRNA stability - identification of cytosolic proteins that interact with an A-rich sequence. *J Biol Chem* 274:1172-1179

- Todorov V, Muller M, Schweda F, Kurtz A** (2002) Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 283(5):R1046-51.
- Tomita S, Tomita N, Yamada T, Zhang L, Kaneda Y, Morishita R, Ogihara T, Dzau VJ, Horiuchi J** (2000) Transcription factor decoy to study the molecular mechanism of negative regulation of renin gene expression in the liver in vivo. *Circ Res* 84:1059-1066
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4354
- Tronik D, Dreyfus M, Babinet C, Rougeon F** (1987) Regulated expression of the Ren-2 gene in transgenic mice derived from parental strains carrying only the Ren-1 gene. *EMBO J* 6:983-987
- Tronik D, Rougeon F** (1988) Thyroxine and testosterone transcriptionally regulate renin gene expression in the submaxillary gland of normal and transgenic mice carrying extra copies of the Ren2 gene. *FEBS Lett* 234:336-340
- Vander AJ** (1967) Control of renin release. *Physiol Rev* 47:359-382
- Vandongen R, and Peart WS** (1974). Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br. J. Pharmac* 50, 125-129
- Voigtländer T, Ganten D, Bader M** (1999) Transcriptional regulation of the rat renin gene by regulatory elements in intron I. *Hypertension* 333:303-311
- Voigtländer T, Ripperger A, Ganten D, Bader M** (1995) Transcriptional silencer in intron I of the rat renin gene. *Adv Exp Med Biol* 377:285-292
- Wagner C, Hinder M, Krämer BK, Kurtz A** (1999) Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* 34:1101-1105
- Wagner C, Jensen BL, Kramer BK, Kurtz A.** (1998) Control of the renal renin system by local factors. *Kidney Int Suppl.* 67: S78-83,
- Wagner C, Kees F, Krämer BK, Kurtz A** (1997). Role of sympathetic nerves form teh stimulatio of the renin system by angiotensin II receptor blockade. *J Hypertens* 15, 1463-1469

- Wagner C, Kurtz A** (1998) Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:437-441
- Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F and Kurtz A** (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J. Clin. Invest* 102, 157-165
- Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A** (1998) Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102:1576-1582
- Wang HC, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M, Firestone GL and Pearce D** (2001) SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am Physiol Renal* 280: F303- F313
- Wehling M** (1997) Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 59: 365-393
- Yamada T, Horiuchi M, Morishita R, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ** (1995) *In vivo* identification of a negative regulatory element in the mouse renin gene using direct gene transfer. *J Clin Invest* 96:1230-1237
- Yamamoto T, Takahashi T, Yonemura K, Matsui K, Nagase M, Hishida A** (1999) Increased transforming growth factor β_2 expression in the glomerular arteriole of the juxtaglomerular apparatus in a Bartter's-like syndrome. *Hum Pathol* 30, 992-995
- Ying L, Morris BJ, Sigmund CD** (1997) Transactivation of the human renin promoter by the cyclic AMP/protein kinase A pathway is mediated by both cAMP-responsive element binding protein-1 (CREB)-dependent and CREB-independent mechanisms in Calu-6 cells. *J Biol Chem* 272:2412-2420
- Yoshioka K, Takemura T, Murakami K, Okada M, Hino S, Miyamoto H, Maki S** (1993): Transforming growth factor- β protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 68: 154–163,
- Yu H, Di Nicolantonio R** (1998) Altered nuclear protein binding to the first intron of the renin gene of the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 20:817-832

7 Anhang

7.1 Publikationen

Klar J, Sandner P, Müller MW, Kurtz A (2002) Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch.* 444(3):335-44

Klar J, Vitzthum H, Kurtz A (2003) Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells (eingereicht)

7.2 Abkürzungsverzeichnis

$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μmol	Mirkomol
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin converting Enzym
Amp	Ampicillin
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklischen Guanosinmonophosphat
cpm	counts per minute
CRE	cAMP responsive element
CREB	cAMP responsive element binding protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GC	Guanylatzyklase
h	Stunde
JG	juxtaglomerular
kb	Kilobasepaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SV40	Simian Virus 40
üN	über Nacht
tRNA	transfer Ribonukleinsäure

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die während der letzten drei Jahre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des interessanten Themas und die Bereitstellung der exzellenten Forschungsbedingungen. Seine ständige Hilfsbereitschaft bei Fragen, seine Anregungen und seine aufmunternden Worte in schwierigen Situationen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Helga Vitzthum und Herrn Dr. Frank Schweda möchte ich für deren stete Hilfsbereitschaft bei der Lösung alltäglicher Laborprobleme danken. Danke auch für das Korrekturlesen des vorliegenden Manuskripts.

Herrn Dr. Peter Sandner danke ich für die Einführung in die Welt der Phosphodiesterasen und für die Überlassung der PCR- Primer der verschiedenen Phosphodiesterasen- Isoformen.

Herrn Dr. Markus Müller danke ich für die Überlassung der p43 und p45 Plasmide.

Frau Marlies Hamann und Herrn Karl- Heinz Götz danke ich für die Hilfe den Versuchen mit der isoliert perfundierten Niere.

Nicht zuletzt möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima, für die Freundlichkeit und die kollegiale Atmosphäre danken.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, 11.02.2003

Jürgen Klar