

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. ARMIN KURTZ
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DAS KALZIUM-PARADOXON DER RENINSEKRETION:
ROLLE KALZIUMREGULIERTER ADENYLATZYKLASEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christian Grünberger
aus Aufeld

2009

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHYSIOLOGIE
PROF. DR. ARMIN KURTZ
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**DAS KALZIUM-PARADOXON DER RENINSEKRETION:
ROLLE KALZIUMREGULIERTER ADENYLATZYKLASEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christian Grünberger
aus Aufeld

2009

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Luchner

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2009

Der erste Schluck aus dem Becher der Naturwissenschaften macht atheistisch,
aber auf dem Grund des Bechers wartet Gott.

Werner Heisenberg (1901 – 1976); Nobelpreisträger für Physik

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung.....	8
1.1. Renin-Angiotensin-Aldosteron System	8
1.2. Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen.....	9
1.3. Regulation der Reninsekretion.....	11
1.3.1. Systemische Regulation der Reninsekretion.....	11
1.3.2. Zelluläre Regulation der Reninsekretion	12
1.3.2.1. cAMP	12
1.3.2.2. cGMP	14
1.3.2.3. Kalzium.....	14
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Material	21
2.1.1. Oligonukleotide.....	21
2.1.2. Chemikalien	22
2.1.3. Puffer und Lösungen.....	22
2.1.4. Versuchstiere.....	22
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Zellbiologische Methoden.....	23
2.2.1.1. Präparation und Kultivierung juxtaglomerulärer Zellen	23
2.2.1.2. Kultivierung und Transfektion von As4.1-Zellen.....	24
2.2.2. Immunologische Methoden.....	25
2.2.2.1. Messung der Reninsekretion	25
2.2.2.2. Bestimmung des cAMP-Gehaltes	26
2.2.2.3. Proteinnachweis mittels Western-Blot.....	26
2.2.3. Gentechnische Methoden	27
2.2.3.1. Gesamt-RNA Isolation aus eukaryontischen Zellen.....	27
2.2.3.2. Bestimmung der mRNA Expression in eukaryontischen Zellen	28
2.2.4. Statistik.....	28
3. Ergebnisse.....	30
3.1. Adenylatzyklaseisoformen in JG-Zellen.....	30
3.2. Experimente an isolierten JG-Zellen.....	31

3.2.1. Modulation des Kalziumgehaltes.....	31
3.2.2. Unspezifische Aktivierung von Adenylatzyklen	32
3.2.3. Unspezifische Hemmung von Phosphodiesterasen.....	34
3.2.4. Stimulation mittels eines cAMP-Analogons.....	37
3.2.5. Spezifische Stimulation am β -Adrenozeptor	40
3.2.6. Korrelation von cAMP-Gehalt und Reninsekretion.....	42
3.2.7. Supraphysiologische cAMP-Stimulation.....	43
3.3. Experimente an As4.1-Zellen.....	46
3.3.1. Knockdown von AC5 und AC6 mit siRNA-Technik	46
3.3.2. Funktionelle Relevanz von AC5 und AC6.....	49
3.3.2.1. Forskolinstimulation	49
3.3.2.2. Isoproterenolstimulation	53
4. Diskussion	57
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64
7. Anhang.....	72
7.1. Publikationen.....	72
7.2. Abkürzungsverzeichnis.....	73
7.3. Danksagung.....	74

1. Einleitung

1.1. Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Die Peptidase Renin ist das Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), welches eine bedeutende Rolle für die Aufrechterhaltung der Salz- und Wasserhomöostase und die Regulation des arteriellen Blutdruckes spielt. Renin spaltet von dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab, welches biologisch jedoch noch inaktiv ist. Erst enzymatische Hydrolyse durch das endothelständige und insbesondere in der Lunge lokalisierte Angiotensin Converting Enzym (ACE) wandelt Angiotensin I in das Oktapeptid Angiotensin II um. Angiotensin II - der biologische Effektor des RAAS - wirkt zum einen vasokonstriktorisch und damit blutdrucksteigernd. Zum anderen fördert Angiotensin II die Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron und auch Angiotensin II selbst bewirken in der Niere eine vermehrte Rückresorption von Kochsalz und Wasser, was zu einem erhöhten Blutvolumen und damit ebenfalls zu einem Blutdruckanstieg führt (Hackenthal et al., 1990; Abb. 1.1).

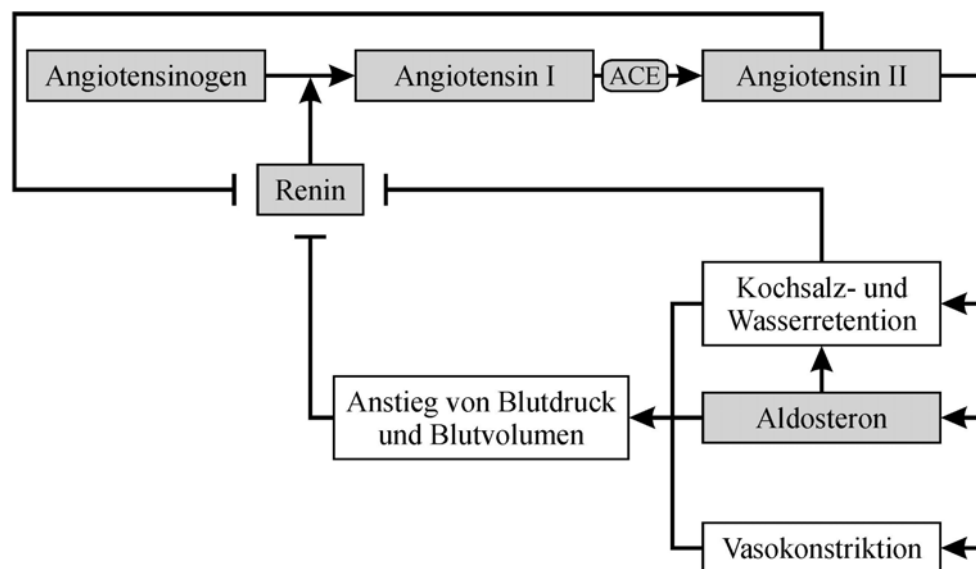


Abb. 1.1 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (Schema). ACE Angiotensin Converting Enzym, ↑ fördert, ⊥ hemmt.

Da unter physiologischen Bedingungen weder die Konzentration des Angiotensinogens noch die des Angiotensin Converting Enzyms für die Bildung von Angiotensin II

limitierend ist, wird die Aktivität des RAAS insbesondere durch die Reninkonzentration im Blut und damit letztlich durch die Reninsekretionsrate gesteuert (Kurtz, 1989).

Sowohl erhöhter Blutdruck - genau genommen erhöhter renaler Perfusionsdruck - als auch eine vermehrte Kochsalzaufnahme des Körpers hemmen im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus die Reninsekretion. Auch Angiotensin II selbst, das Endprodukt der Renin-Angiotensin-Kaskade übt einen negativen Effekt auf die Synthese und Sekretion von Renin aus (Hackenthal et al. 1990; Abb. 1.1).

In der heutigen klinischen Anwendung haben sowohl ACE-Hemmstoffe (Prilate), wie auch Angiotensin II – Rezeptorantagonisten (Sartane) einen enormen Stellenwert in der Therapie von Arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz eingenommen. Dies unterstreicht die Bedeutung des RAAS für die Pathophysiologie dieser häufigen internistischen Erkrankungen und daher letztendlich auch die Notwendigkeit die genauen Regulationsmechanismen der Reninsekretion zu verstehen.

1.2. Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen

Das im Blut zirkulierende Renin wird bei allen bisher untersuchten Säugetieren vor allem in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) der Niere synthetisiert (Bader und Ganten, 2000). Im Nephron liegen die JG-Zellen in der Tunica media der afferenten Arteriole in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Gefäßpolen der Glomeruli und bilden zusammen mit den Zellen der Macula densa und den extraglomerulären Mesangiumzellen den juxtaglomerulären Apparat (Abb. 1.2). Darüber hinaus stehen die JG-Zellen mit den Macula densa-Zellen in Verbindung, die eine wichtige Rolle für die Regulation der glomerulären Filtrationsrate und der renalen Kochsalzausscheidung spielen (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984). Neben dem systemischen Renin-Angiotensin-System, das durch die Reninfreisetzung aus den JG-Zellen in das Blut gesteuert wird, sind noch weitere lokale Renin-Angiotensin-Systeme in unterschiedlichen Geweben (z.B. Nebenniere, Herz, Gehirn) beschrieben worden.

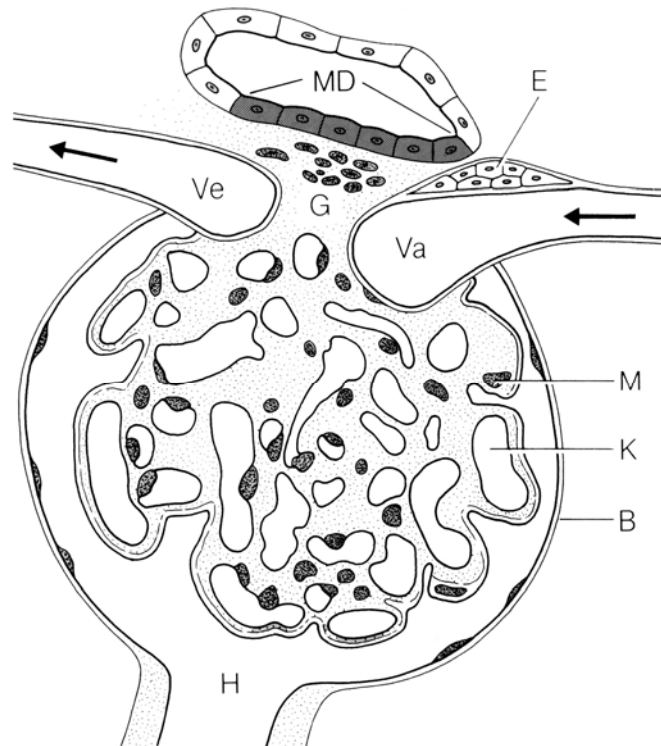


Abb. 1.2 Juxtaglomerulärer Apparat (Schema). *MD* Macula densa, *G* extraglomeruläre Mesangiumzellen = Goormaghtigh-Zellen, *E* granuliert epitheloide, juxtaglomeruläre Zellen, *Va* Vas afferens, *Ve* Vas efferens, *K* Kapillare des Glomerulus, *M* glomeruläres Mesangium, *B* Bowman-Kapsel, *H* Harnpol (aus Schiebler TH, 1996).

Die Zahl der reninbildenden Zellen sinkt im Allgemeinen mit zunehmendem Alter eines Organismus. Bei chronischer Stimulation des Reninsystems erfolgt jedoch eine Transformation von glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole zu reninproduzierenden Zellen (Rekrutierung) und entgegengesetzt kommt es bei Unterdrückung des Reninsystems zu einer zahlenmäßigen Abnahme von JG-Zellen (Barajas 1979, Taugner et al. 1984).

Die Reninsekretionsrate von JG-Zellen kann sich innerhalb weniger Minuten schnell verändern. In diesem Kontext konnten Taugner et al. (1984) in histologischen Untersuchungen die Fusion von Reninvesikeln mit der Plasmamembran zeigen, was auf einen Exozytoseprozess hindeutet. Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass die elektrische Kapazität der JG-Zellen bei Reninsekretion zunimmt, was als eine Vergrößerung der Zelloberfläche durch den Vesikeleinbau verstanden werden kann (Friis et al., 1999). Des Weiteren findet die Freisetzung von Renin aus JG-Zellen eher in Quanten als kontinuierlich statt, was ebenfalls die Hypothese der Exozytose stützt (Skott, 1986; Peti-Peterdi et al., 2004).

1.3. Regulation der Reninsekretion

1.3.1. Systemische Regulation der Reninsekretion

Die Freisetzung von Renin aus den JG-Zellen der Niere wird im Körper durch eine Vielzahl von lokalen und systemisch wirksamen Mechanismen kontrolliert und koordiniert.

Bei den systemisch wirksamen Mechanismen spielt der **Salzhaushalt** des Körpers für die Reninsekretionsrate eine entscheidende Rolle und ist mit dieser reziprok verknüpft. Ein erhöhter Kochsalzbestand, z.B. durch vermehrte Kochsalzzufuhr mit der Nahrung, führt zu einer Hemmung des Reninsystems, während eine kochsalzarme Diät zu einer Stimulation führt. Die durch die Aktivierung des Reninsystems hervorgerufenen Änderungen der Plasmakonzentrationen von Angiotensin II und Aldosteron modulieren die tubuläre Kochsalzrückresorption und wirken so der Störung des Salzhaushaltes entgegen. Dabei sind die Zellen der Macula densa von wesentlicher Bedeutung (Goormaghtigh, 1937; Vander, 1967). Diese detektieren die Kochsalzkonzentration im Tubuluslumen und beeinflussen auf bisher nicht verstandene Weise die Reninfreisetzung aus den JG-Zellen.

Ein zweiter wichtiger Kontrollfaktor der Reninsekretion ist der **renale Perfusionsdruck**, der im physiologischen Fall den systemischen Blutdruck widerspiegelt. Während eine Verringerung des renalen Blutdruckes die Reninausschüttung fördert, hemmt ein Druckanstieg in der Nierenarterie die Reninfreisetzung. Da das RAAS wiederum über gesteigerte Kochsalzrückresorption und damit Wasserretention, sowie auch durch die von Angiotensin II verursachte Vasokonstriktion blutdrucksteigernd wirkt, entsteht ein Regelkreis im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus (Nafz et al. 1997; Wagner und Kurtz, 1998).

Bei den systemischen Kontrollfaktoren der Reninfreisetzung ist als drittes das **sympathische Nervensystem** zu nennen. Durch zirkulierende oder lokal freigesetzte Katecholamine werden β -adrenerge Rezeptoren, die auf JG-Zellen besonders stark exprimiert werden, stimuliert. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Adenylatzyklen und folglich zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes, was die Reninsynthese und Reninsekretion in den JG-Zellen steigert (Holmer et al., 1997; Kurtz, 1997; Schweda und Kurtz, 2004).

Schließlich wirkt auch das Endprodukt des RAAS, **Angiotensin II**, auf die Sekretionsrate von JG-Zellen ein. Im Sinne einer negativen Rückkopplung unterdrückt es direkt über AT₁-Rezeptoren auf JG-Zellen die Reninausschüttung (Kurtz und Wagner, 1999). Im gleichen Kontext stimulieren Angiotensin II – Rezeptorantagonisten und Hemmstoffe des Angiotensin Converting Enzyms (ACE-Hemmer) die Reninsekretion und die Rekrutierung reninbildender Zellen in afferenten Arteriolen (Campbell, 1996).

Neben den erwähnten systemischen Faktoren, die auf die Reninfreisetzung Einfluss nehmen, wird diese auch durch eine Reihe von **lokal sezernierten Faktoren** gesteuert. Prostaglandin E₂ und I₂ (*Prostazyklin*), CGRP (*Calcitonin gene related peptide*), Adrenomedullin und Stickstoffmonoxid stimulieren beispielsweise die Reninfreisetzung (Keeton und Campbell, 1981; Jensen et al., 1996; Jensen et al., 1997; Kurtz et al., 1988b; Kurtz und Wagner, 1998). Im Gegensatz dazu führen PAF (*Platelet-activating factor*), Angiotensin II und Endotheline zu einer Hemmung der Reninsekretion (Keeton und Campbell, 1981; Pfeilschifter et al., 1985; Kurtz und Penner, 1989; Scholz et al., 1995).

1.3.2. Zelluläre Regulation der Reninsekretion

Die im vorhergehenden Abschnitt erwähnten systemischen Kontrollmechanismen der Reninsekretion werden auf zellulärer Ebene im Wesentlichen durch drei Signalkaskaden vermittelt, die über die Signalmoleküle Kalzium, zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) koordiniert werden. Während cAMP ausschließlich stimulierend auf die Reninfreisetzung wirkt, kann cGMP sowohl fördernde als auch hemmende Funktion haben. Der Effekt einer erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentration auf die Sekretion von Renin ist überraschenderweise und im Gegensatz zu anderen sekretorischen Zellen nicht stimulierend, sondern inhibierend, was als „Kalzium-Paradoxon“ der Reninfreisetzung bezeichnet wird.

1.3.2.1. cAMP

Die stimulatorische Wirkung von cAMP auf die Reninsekretion ist schon seit langem bekannt und die cAMP-Kaskade ist wohl der wichtigste Signalweg, über den die Reninfreisetzung aus JG-Zellen gesteuert wird. Der cAMP-Gehalt einer Zelle wird

durch das Zusammenspiel von Adenylatzyklasen (AC) und Phosphodiesterasen (PDE), welche cAMP auf- bzw. abbauen, reguliert. Eine rezeptorvermittelte Aktivierung von AC, z.B. durch Stimulation β -adrenerger Rezeptoren führt zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in den JG-Zellen und steigert sowohl in vivo als auch in vitro Modellen sehr schnell die Reninsekretionsrate (Hackenthal et al., 1990; Kurtz und Wagner, 1999). Aber auch eine Aktivierung von AC durch andere Substanzen wie etwa Calcitonin gene related peptide (Kurtz et al., 1988b), Prostaglandin E₂ oder I₂ (Jensen et al., 1996), Dopamin (Kurtz et al., 1988a), Glucagon (Vandongen, 1976) oder Adrenomedullin (Jensen et al., 1997) bewirkt eine Steigerung der Reninfreisetzung. Analog dazu löst eine rezeptorvermittelte Hemmung der AC-Aktivität über Adenosin-A₁-Rezeptoren eine Unterdrückung der Reninausschüttung aus (Weihprecht et al., 1990). Daneben bestätigte eine direkte Aktivierung von AC durch Forskolin (Kurtz et al., 1984) und schließlich auch eine direkte Applikation von cAMP in die JG-Zelle (Friis et al., 1999) den stimulatorischen Effekt von cAMP auf die Reninsekretion. Insgesamt betrachtet, scheint die zytosolische Konzentration von cAMP und nicht die Art seiner Generierung wesentlich für die Reninfreisetzung zu sein.

Die oben genannten Befunde spiegeln sich auch in dem Einfluss von Phosphodiesterasen (PDE) auf die Reninfreisetzungsraten wieder. Wie bereits erwähnt, sind die PDE, die cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) spalten, für den intrazellulären Abbau von cAMP zuständig und so an der Regulation des zytosolischen cAMP-Gehaltes einer Zelle beteiligt. Insbesondere die Isoformen PDE-3 und PDE-4 scheinen speziell in der Kontrolle der Reninsekretion eine Rolle zu spielen (Chiu und Reid, 1996; Chiu et al., 1996; Chiu et al., 1999). Die PDE-3 nimmt dabei eine besondere Rolle ein, da sie durch cGMP gehemmt wird. Sie verknüpft so die cGMP-Signalkaskade mit dem cAMP-Weg der Reninregulation, was im folgenden Abschnitt noch näher beleuchtet werden wird. Der molekulare Mechanismus mit dem cAMP selbst Einfluss auf die Reninfreisetzung nimmt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, wobei aber wohl die Proteinkinase A (PKA) und auch Kalzium von Bedeutung sind. Einerseits könnte es über eine cAMP abhängige Stimulation der PKA zur Aktivierung einer Protonenpumpe in den Reninvesikeln kommen. Der dadurch erhöhte Protonengradient würde dann konsekutiv über einen K^+/H^+ -Austauscher zu einem K^+ -Einstrom in die Vesikel führen, was ein Anschwellen der Vesikel und schließlich die Exozytose von Renin verursacht (King und Fray, 1994). Daneben wirkt PKA relaxierend auf das Aktin-Myosin-Netzwerk der JG-Zellen, wodurch auf mechanische

Weise die Freisetzung von Reninvesikeln erleichtert werden könnte (Kurtz und Wagner, 1999). Andererseits gibt es auch Hinweise, dass cAMP die Kalziumkonzentration in JG-Zellen beeinflusst und somit den inhibitorischen Effekt von Kalzium abmildern kann (Kurtz, 1989).

1.3.2.2. cGMP

Eine Beteiligung des Second Messenger cGMP an der Steuerung der Reninsekretion wurde schon mehrmals beschrieben (Kurtz, 1989; Reid und Chiu, 1995; Romeo, 1992). Allgemein wird in der Zelle die cGMP-Bildung aus Guanosin triphosphat (GTP) durch membranständige und lösliche Guanylatzyklen katalysiert. Die lösliche Form der Guanylatzyklase wird durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert, während membranständige Guanylatzyklen Rezeptoren sind und beispielsweise das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) als Ligand binden.

Die Rolle von cGMP für die Reninregulation ist insgesamt jedoch relativ komplex und wird kontrovers diskutiert: Einerseits ist die bereits im vorherigen Abschnitt erwähnte PDE-3 durch cGMP hemmbar. Somit kann cGMP-abhängig der cAMP-Spiegel der JG-Zelle moduliert und so die Reninsekretion gesteuert werden (Beavo, 1995). Dieser Weg ist wohl für die Steigerung der Reninsekretion durch NO von Bedeutung (Kurtz et al., 1998a; Reid und Chiu, 1995; Friis et al., 2002). Andererseits kann cGMP aber auch durch eine Aktivierung der Proteinkinase G Typ II hemmend auf die Reninfreisetzung wirken (Kurtz und Wagner, 1998; Gambaryan et al., 1998; Wagner et al., 1998b).

Zusammenfassend wird die Reninfreisetzung also durch cGMP sowohl gesteigert, als auch inhibiert. Da die PDE-3 eine höhere Affinität für cGMP hat als die Proteinkinase G Typ II und der Hemmeffekt eben dieser Proteinkinase aber die cAMP-abhängige Stimulation der Reninsekretion abschwächen kann, liegt die Vermutung nahe, dass niedrige cGMP-Spiegel die Reninsekretion steigern, während sie höhere eher abschwächen (Schweda und Kurtz, 2004).

1.3.2.3. Kalzium

Erstaunlicherweise und anders als in anderen sekretorischen Zellen des Organismus hemmt eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in JG-Zellen die Freisetzung des Sekretionsproduktes, nämlich Renin. Dieser Effekt, der mit dem Begriff „Kalzium-Paradoxon“ beschrieben wurde, ist außer in JG-Zellen nur noch in

Nebenschilddrüsenzellen bekannt (Care et al., 1966; Habener et al., 1984; Hackenthal et al., 1990; Taugner et al., 1988).

Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Reninfreisetzung durch klassische Vasokonstriktoren, wie etwa Vasopressin, Angiotensin II oder Endothelin (Vander und Geelhoed, 1965; Vandongen und Peart, 1974; Kurtz et al., 1986; Hackenthal et al., 1990; Ritthaler et al., 1995) von der Verfügbarkeit extrazellulären Kalziums abhängig ist (Vandongen und Peart, 1974; Naftilan und Oparil, 1982; Scholz et al. 1994; Ritthaler et al., 1995). Außerdem erhöhen diese vasokonstriktorischen Hormone den Kalziumeinstrom in JG-Zellen (Kurtz et al., 1986). Da die extrazelluläre und intrazelluläre Kalziumkonzentration in JG-Zellen gleichsinnig miteinander korreliert sind, lassen die Befunde vermuten, dass eine Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Gehaltes für die inhibitorische Wirkung dieser Hormone ursächlich ist.

Wie jedoch die zytosolische Kalziumkonzentration in JG-Zellen reguliert wird, ist noch derzeit noch nicht im Detail verstanden. Insbesondere die Rolle von L-Typ Kalziumkanälen wird in diesem Kontext kontrovers diskutiert. Während einige Studien eine inverse Beziehung zwischen der Reninsekretionsrate und der Aktivität von L-Typ Kalziumkanälen beschreiben (Baumbach und Skott, 1981; Marre et al., 1982; Matsumura et al. 1985; Churchill et al., 1990; Jones-Dombi und Churchill 1993; Roy et al., 1994), können andere Untersuchungen diese Erkenntnisse nicht bestätigen (Dietz, 1986; Scholz und Kurtz, 1992). Auch funktionelle Untersuchungen an JG-Zellen liefern differente Befunde über die Rolle von L-Typ Kalziumkanälen in JG-Zellen (Kurtz und Penner, 1989; Kurtz et al., 1990; Scholz und Kurtz, 1995; Friis et al., 2003). Inwieweit die verschiedenen Versuchsmodelle der einzelnen Studien, bei denen JG-Zellen entweder in ihrem natürlichen Zellverband oder in isolierter Form untersucht wurden, einen Einfluss auf diese unterschiedlichen Ergebnisse haben, ist ebenfalls noch unklar (Schweda und Kurtz, 2004).

Anders als bei L-Typ Kalziumkanälen konnte für so genannte T-Typ Kalziumkanäle in isolierten JG-Zellen keine direkte Wirkung auf die Reninfreisetzungsrates gefunden werden. Zwar konnten konzentrationsabhängige Effekte auf die Plasmareninaktivität und die Renin mRNA Expression nachgewiesen werden (Wagner et al., 1998a), diese Effekte scheinen jedoch eher indirekter Natur zu sein.

Daneben nimmt die Kalziumfreisetzung aus endoplasmatischen Speichern Einfluss auf die Reninausschüttung. Durch pharmakologische Blockierung der Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher kann die Reninfreisetzungsrates gesteigert werden,

weshalb man im Umkehrschluss annehmen kann, dass eine zytoplasmatische Kalziumkonzentrationszunahme die Reninsekretion hemmt (Antonipillai und Horton, 1985; Baxter et al., 1985; Hackenthal und Taugner, 1986). Die Leerung intrazellulärer Kalziumspeicher wird hauptsächlich durch Inositoltrisphosphat (IP₃) vermittelt. IP₃ entsteht neben Diacylglycerin aus Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat im Phospholipase C Signalweg. Dieser Kaskade entsprechend wird in JG-Zellen durch Angiotensin II die Phospholipase C aktiviert, was konsekutiv zu einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration führt und letztlich die Reninsekretion hemmt. Diese Hemmwirkung von Angiotensin II kann durch pharmakologische Blockade der intrazellulären Kalziumfreisetzung abgeschwächt werden (Baxter et al., 1995; Hackenthal und Taugner, 1986). Der Prozess der Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher selbst führt in JG-Zellen zur Aktivierung so genannter calcium release activated calcium channels (CRAC). Diese Kanäle können pharmakologisch durch Inhibition der sarkoplasmatischen Ca²⁺-ATPase mit Thapsigargin aktiviert werden, da Thapsigargin den Rücktransport von Kalzium ins sarkoplasmatische Retikulum unterbindet und so für eine Entleerung zytosolischer Kalziumspeicher sorgt. Eine Aktivierung der CRAC durch Thapsigargin führt in der Tat zu einer Hemmung der Reninfreisetzung unter basalen und stimulierten Bedingungen (Schweda et al., 2000). Eine Beteiligung solcher CRAC könnte auch in der Wirkung von Angiotensin II auf JG-Zellen von Bedeutung sein, da Angiotensin II sowohl Kalzium aus intrazellulären Speichern mobilisiert als auch die Kalziumpermeabilität der Zellmembran erhöht (Kurtz und Penner, 1989).

Neben dem Einstrom spielt auch die Entfernung von Kalzium aus dem Zytosol eine bedeutende Rolle für die intrazelluläre Kalziumkonzentrationszunahme. Wie bereits oben erwähnt, kann durch eine Blockade sarkoplasmatischer Ca²⁺-ATPasen mit Thapsigargin eine Inhibition der Reninsekretion erreicht werden, was eine Beteiligung dieser Art des Kalziumabtransportes für die Kontrolle der Reninfreisetzung nahe legt. Aber auch in der Zellmembran lokalisierte Ca²⁺-ATPasen sind wahrscheinlich für die Regulation der Reninsekretion von Bedeutung (Sundet et al., 1984; Churchill et al., 1990).

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass sowohl Kalziueinstrom von extrazellulär als auch eine Entleerung intrazellulärer Kalziumspeicher für die Kontrolle der Reninsekretionsrate eine Bedeutung haben (Schweda und Kurtz, 2004).

Auf welche Weise nun die Kalziumkonzentration selbst Einfluss auf den Exozytosevorgang nimmt, ist bisher nicht endgültig geklärt. Es gibt jedoch mehrere plausible Hypothesen. Wie bereits bei der Beschreibung der Effekte von cAMP erwähnt, könnte das Aktin-Myosin-Netzwerk der JG-Zellen für die Reninfreisetzung eine Rolle spielen. Die Myosin-ATPase, welche den Kontraktionszyklus zwischen Aktin und Myosin katalysiert, ist nur in phosphorylierter Form aktiv. Für diese Phosphorylierung ist die durch den Kalzium/Calmodulin-Komplex regulierte Myosinkinase zuständig. In der Tat stimuliert eine Inhibition der Calmodulin-Aktivität die Reninsekretion (Schwertschlag und Hackenthal, 1983; Park et al., 1986; Della Bruna et al., 1992). Des Weiteren wird die Myosinkinase durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A reguliert, was wiederum eine Verbindung zum cAMP-Signalweg der Reninsekretion darstellt. Auch im schon angesprochenen Modell der Vesikelschwellung über eine cAMP-abhängige Aktivierung einer Protonenpumpe und eines K^+/H^+ -Austauschers könnte Kalzium durch Hemmung des K^+/H^+ -Austauschers eine regulatorische Funktion einnehmen (King und Fray, 1994; King et al., 1993). Darüber hinaus könnte der Kalzium/Calmodulin-Komplex auch über andere Mechanismen Einfluss auf die der Exozytose vorangehenden Vesikelschwellung nehmen (Park et al., 1992). Daneben ist auch eine Wirkung von Kalzium auf Chloridkanäle und Kaliumkanäle in JG-Zellen beschrieben, was eine Steuerung der Reninsekretion über elektrische Zellphänomene möglich erscheinen lässt (Kurtz und Penner, 1989). Da das Ruhemembranpotential von JG-Zellen negativer ist als das Gleichgewichtspotential für Chlorid und zugleich positiver als das Kaliumgleichgewichtspotential ist, kann man vermuten, dass ein intrazellulärer Kalzium-Anstieg zu einer Abnahme der Kalium- und Chloridkonzentration in der Zelle führt (Bührle et al., 1995; Loutzenhiser et al., 1997). Da aber sowohl Kalium- als auch Chloridionen am Anschwellen von Reninvesikeln beteiligt sind, könnte so die Reninfreisetzung abgeschwächt werden. In der Tat stimuliert Chlorid die Reninausschüttung und der sekretionshemmende Effekt von Kalzium wird durch die Blockade von Chloridkanälen abgeschwächt (Skott und Jensen, 1992; Jensen und Skott, 1994; Jensen et al., 1999). Weiterhin wäre auch denkbar, dass Kalzium seinen hemmenden Effekt auf die Reninfreisetzung über die Proteinkinase C (PKC) vermittelt. Wie bereits oben erwähnt, aktivieren vasokonstriktorische Hormone, wie etwa Angiotensin II oder Endothelin intrazellulär die Phospholipase C, was konsekutiv zur Bildung von IP₃ und Diacylglycerin (DAG) führt. So kommt es einerseits IP₃-vermittelt zu einer Kalziummobilisierung aus intrazellulären Speichern

und andererseits zu einer DAG-bedingten Aktivierung der PKC. Da die PKC-Aktivität von der Verfügbarkeit von Kalzium abhängig ist, könnte eine Veränderung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration Einfluss auf die Aktivität der PKC und so auf die Reninfreisetzungsraten nehmen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine direkte pharmakologische Aktivierung der PKC die Reninsekretion inhibiert (Kurtz et al., 1986). Darüber hinaus kann der hemmende Effekt von Endothelinen durch pharmakologische Blockade der PKC abgeschwächt werden (Münter und Hackenthal, 1989; Ritthaler et al., 1996). Auf welche Weise jedoch die PKC die Reninfreisetzung beeinflusst, ist weitgehend unklar, wenn auch eine Stabilisierung des Aktin-Myosin-Netzwerkes durch die PKC eine Rolle spielen könnte.

Insgesamt betrachtet, scheint der inhibierende Effekt von Kalzium auf die Reninsekretion gesichert, obwohl der Wirkmechanismus noch weitgehend unbekannt ist und eine Fülle verschiedener Erklärungsmodelle entwickelt wurde. Insbesondere auch die Möglichkeit der Verknüpfung und Koordination des Kalziumsignalweges mit den anderen Signalwegen gilt es noch zu klären.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Wie in den obigen Abschnitten deutlich geworden ist, sind die molekularen Mechanismen der Reninregulation noch in großen Teilen unverstanden. In den zahlreichen über die Jahrzehnte hin zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen kristallisierten sich jedoch unter anderem zwei Kernpunkte heraus: Zum einen stellt die cAMP-Signalkaskade den Hauptstimulationsweg für die Reninfreisetzung dar und zum anderen hat Kalzium einen paradox hemmenden Einfluss auf diesen Sekretionsprozess. Die Grundidee dieser Arbeit war deswegen eine mögliche Verknüpfung zwischen diesen beiden gegensätzlichen Regulatoren der Reninausschüttung aufzudecken und somit einen Lösungsansatz für das „Kalzium-Paradoxon“ zu finden.

Die zentralen Regulatoren des cAMP-Gehaltes einer Zelle sind neben den Phosphodiesterasen (PDE), welche cAMP hydrolysieren, die Adenylatzyklen (AC), welche die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysieren. Bisher wurden neun verschiedene Isoformen, AC1-9, in Säugern charakterisiert (Hanoune et al., 1997; Iyengar, 1993; Simonds, 1999; Sunahara et al., 1996). Diese unterscheiden sich in ihrer

Eigenschaft von G-Protein Untereinheiten, PKC oder intrazellulärem Kalzium stimuliert bzw. inhibiert zu werden. Während die Aktivität aller Adenylatzyklen durch supraphysiologische Kalziumkonzentrationen gehemmt wird, ist nur für die Isoformen AC5 und AC6 eine Aktivitätshemmung im physiologischen Kalziumkonzentrationsbereich beschrieben worden (Cooper et al., 1994; Cooper et al., 1998; Mons und Cooper, 1994; Chabardès et al., 1999; Hanoune und Defer, 2001). Daneben können diese beiden Isoformen auch durch die Proteinkinase A, welche eine Rolle in der Reninsekretion zu spielen scheint, phosphoryliert und dadurch direkt inhibiert werden (Chen et al., 1997; Iwami G et al., 1995). Des Weiteren gelang es mittels mRNA-Expressions-Untersuchungen diese Isoformen im Nierengewebe und insbesondere auch im Bereich der Glomeruli nachzuweisen (Bek et al., 2001; Chabardès et al., 1996; Defer et al., 2000).

Darüber hinaus existieren aber auch funktionelle Hinweise, dass die kalziumaktivierte PDE-1, die in JG-Zellen exprimiert wird, eine Rolle in der Regulation der Reninfreisetzung spielt. Eine pharmakologische Blockade dieses Enzyms steigert die Reninsekretion in isoliert perfundierten Nieren und erhöht die cAMP-Spiegel in reninproduzierenden Zellen (Kurtz et al., 1998b; Klar et al., 2002).

Die Arbeitshypothese dieser Untersuchung war also, dass Kalzium seine hemmende Wirkung auf die Reninsekretion über eine Suppression des zellulären cAMP-Gehaltes ausübt, was seinen paradox inhibierenden Effekt auf die Reninfreisetzung erklären würde. Dieser Effekt könnte durch mehrere Mechanismen kontrolliert werden. Sowohl eine Hemmung des Aufbaus von cAMP durch Kalzium, als auch eine kalziumbedingte Aktivierung des Abbaus von cAMP erscheinen in diesem Kontext möglich. Daneben ist auch eine direkte Wechselwirkung der Kalziumionen mit dem cAMP-Molekül denkbar (Abb. 1.3).

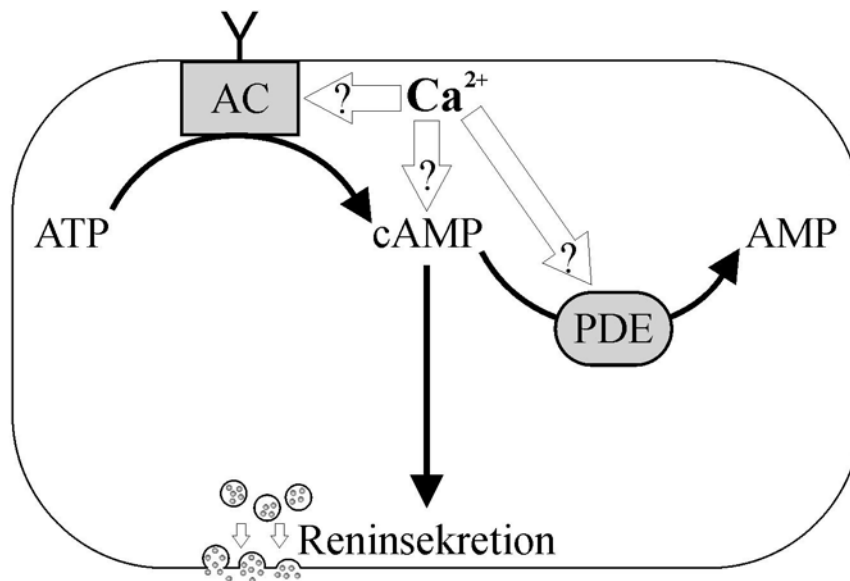


Abb. 1.3 Mögliche Einflusswege von Kalzium auf den cAMP-Gehalt von JG-Zellen.
AC Adenylatzyklase, *PDE* Phosphodiesterase, *ATP* Adenosintri-phosphat, *cAMP* zyklisches Adenosinmonophosphat, *AMP* Adenosinmonophosphat.

Aufgrund der genannten Eigenschaften sind auf Seiten des cAMP-Aufbaus die Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 von besonderem Interesse, da ihre Aktivität kalziumabhängig gehemmt wird. Auf Seiten des cAMP-Abbaus könnte die PDE-1 eine Rolle spielen, weil sie wie oben erwähnt durch Kalzium aktiviert wird. Für eine direkte Interaktion von Kalzium und cAMP gibt es zwar bisher keine Modelle, sie erscheint jedoch zumindest theoretisch möglich.

Ob eine solche Interaktion zwischen Kalzium und cAMP-Gehalt in JG-Zellen tatsächlich stattfindet ist bisher völlig unklar, sie scheint jedoch aufgrund der Vorbefunde aus anderen Untersuchungen durchaus möglich. Insbesondere die Entdeckung kalziumhemmbarer Adenylatzyklaseisoformen in den letzten Jahren könnte für die Verknüpfung von Kalzium- und cAMP-Gehalt eine entscheidende Rolle spielen und einen Lösungsansatz für das so genannte „Kalzium-Paradoxon“ bieten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Interaktion von Kalzium und cAMP-Gehalt in reninproduzierenden Zellen beleuchtet und dabei vor allem auf die Rolle kalziumhemmbarer Adenylatzyklaseisoformen fokussiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Oligonukleotide

Die Spezifität der verwendeten Primer (Tab. 2.1) wurde mittels RT-PCR an cDNA-Extrakten aus Gehirn- und Nierengewebe von Mäusen überprüft. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte auf 2 % Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen, wobei alle Primerpaare PCR-Produkte der erwarteten Länge lieferten. Die PCR-Banden wurden ausgeschnitten, gereinigt (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) und die PCR-Produkte anschließend sequenziert (Sequiserie).

Verwendung	Sequenz	Amplifikat
AC1 sense	5'-GGCCTAACCAGCTCTCCTC-3'	169 bp
AC1 antisense	5'-ACGGGATTTCTCACAGTT-3'	
AC2 sense	5'-GGAGATCGAAACCATGGAGA-3'	150 bp
AC2 antisense	5'-ATGGAGGCAAACATGACACA-3'	
AC3 sense	5'-TGAGGAGAGCATCAACAACG-3'	157 bp
AC3 antisense	5'-TGGTGTGACTCCTGAAGCTG-3'	
AC4 sense	5'-GTGTCCACCTCCACTCCACT-3'	170 bp
AC4 antisense	5'-AAGTCCTTCGACTGCTTCCA-3'	
AC5 sense	5'-CGCTGCTCTCGGCTTAGGCA-3'	161 bp
AC5 antisense	5'-GCGCCGGACGCAGAGATGTC-3'	
AC6 sense	5'-GCATCGGCAAGCTGGCCATGACC-3'	110 bp
AC6 antisense	5'-GACGCCAAGCAGTAGATCATAG-3'	
AC7 sense	5'-TCCTGTCTGATGCACAAAGC-3'	224 bp
AC7 antisense	5'-TTCAAACCTCCTCGTGCTCCT-3'	
AC8 sense	5'-TAGCACCCATCCTAGCCATC-3'	250 bp
AC8 antisense	5'-AAAGTGGTGGCTGTTTGTCC-3'	
AC9 sense	5'-CCAGGAGCACCTTTCTCAAG-3'	220 bp
AC9 antisense	5'-GGTGCCTTCTGTATGGAGGA-3'	

Tab. 2.1 Verwendete Primerpaare. *bp* Länge in Basenpaaren.

2.1.2. Chemikalien

Die aktiven Substanzen Forskolin, 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX), Thapsigargin, Endothelin-1, Angiotensin II, Isoproterenol und cAMP-Acetoxy-methylester (cAMP/AM) wurden von Sigma (Deisenhofen) bezogen. In Vorversuchen wurde die jeweilige maximal effektive Konzentration für die einzelnen Stimulantien bestimmt.

2.1.3. Puffer und Lösungen

10x PBS, pH 7,4:	80 g NaCl, 2 g KCl, 6,8 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O, 2,4 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 l dd H ₂ O
10x Lösung 1, pH 7,4:	3,7 g KCl, 76 g NaCl, 2,9 g CaCl ₂ , 18 g Glucose, 69 g Saccharose, 12,1 g Tris, ad 1 l dd H ₂ O
Lysepuffer:	1x PBS, 0,1 Vol.-% Triton X-100
10x TBE:	108 g TRIS, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M Na ₂ EDTA, pH 8,0, ad 1 l dd H ₂ O
Lösung D:	250g Guanidinium Thiocyanat 4 M, 293 ml H ₂ O, 125 ml 0,1 M Na-Citrat, 26,4 ml 10 % Sarcosyl, vor Gebrauch 360 µl 2-Mercaptoethanol pro 50 ml Lösung zugeben
Wassergesättigtes Phenol:	1 kg Phenol bei ca. 60 °C schmelzen, 1,5 l DEPC-H ₂ O, 0,1 % Hydroxychinolin, aufgießen, schütteln, Phasen trennen lassen
2 M Natriumacetat pH4:	41,02 g Natriumacetat, 120 ml Eisessig, pH 4, ad 250 ml DEPC-H ₂ O
DEPC-H ₂ O:	0,1 Vol.-% DEPC in dd H ₂ O lösen, schütteln, über Nacht stehen lassen, dann autoklavieren

2.1.4. Versuchstiere

Die Versuche wurden an 6-8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen (Charles River GmbH, Sulzfeld) durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Präparation und Kultivierung juxtaglomerulärer Zellen

Die Isolation von juxtaglomerulären Zellen aus Mäusenieren wurde nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Kurtz und Schweda, 2000).

Zwei C57BL/16 Mäuse wurden nach Narkose mit Sevofluran durch Genickbruch getötet und je beide Nieren antiseptisch entnommen. Nach Entfernung der jeweiligen Nierenkapseln wurden die Nieren in steriler Lösung 1 gewaschen und danach zügig mit einem sterilen Skalpell in Stückchen von etwa 1 mm³ Größe zerkleinert. Die Nierenstücke wurden anschließend in vorgewärmter Verdauungslösung (30 ml Lösung 1 mit 53 mg Trypsin und 75 mg Collagenase 1) bei 37 °C unter ständigem Rühren für maximal 90 min inkubiert. Nach visuell verifiziertem Nierenverdau wurde die gewonnene Zellsuspension über einen 22 µm Nylon-Filter gebracht und die den Filter passierenden Einzelzellen gesammelt. Die Einzelzellsuspension wurde schließlich bei 2200 rpm für 7 min bei Raumtemperatur pelletiert und zweimal mit 50 ml Lösung 1 gewaschen. Danach wurden die pelletierten Zellen in 4 ml Lösung 1 resuspendiert, die gereinigte Zellsuspension mit 26 ml 30 % isoosmotischer Percolllösung (Pharmacia) gemischt und bei 11000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Von den nach der Dichtegradientenzentrifugation typischerweise erscheinenden 4 Banden akkumulierter Zellen wurde Dritte von oben mit der höchsten spezifischen Reninaktivität (Dichte: 1.07 g/ml) abgesaugt und die gewonnenen Zellen erneut zweimal in 50 ml Lösung 1 gewaschen. Zum Schluss wurde das Zellpellet in 4 ml RPMI 1640-Medium mit Zusatz von 2 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,66 U/ml Insulin aufgenommen und in 100 µl Aliquots auf 96-Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert. Nach etwa 24 h Anwachsen der Zellen in den Kulturplatten wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, um die nicht-adhärenenten Zellen zu entfernen. Zur experimentellen Modulation der Reninsekretion wurden die JG-Zellen dann mit 100 µl Medium, welches eine oder eine Kombination von mehreren aktiven Substanzen enthielt, für weitere vier Stunden inkubiert. Für die verschiedenen Wirkstoffe wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet, wobei folgende Konzentrationen im Stimulationsmedium erreicht wurden: Thapsigargin 0,01 Vol.-% DMSO, Forskolin 0,05 Vol.-% DMSO, IBMX 0,2 Vol.-% DMSO, cAMP/AM 0,1 Vol.-%

% DMSO. In Vorversuchen wurde ausgeschlossen, dass DMSO in den verwendeten Konzentrationen Effekte auf die Reninsekretion ausübt. Nach Ende der Inkubationsphase wurden die Kulturüberstände abgenommen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, um abgelöste Zellen zu entfernen. Die Zellsedimente in den Wells wurden durch Zugabe von je 100 µl Lysepuffer und Schütteln für 20 min bei Raumtemperatur lysiert. Schließlich wurden die Zellysate zur Befreiung von Zelltrümmern für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Überstände von Kulturmedium und Zellysate wurden dann bis zur Bestimmung der Reninaktivität bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der cAMP-Konzentrationen der Zellen wurden die Kulturüberstände abgenommen und verworfen. Die Zellyse erfolgte hier mit je 100 µl 0,1 M Salzsäure pro Well, Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens 10 min und anschließender Lagerung bei -20 °C.

2.2.1.2. Kultivierung und Transfektion von As4.1-Zellen

Die reninbildende As4.1-Zelllinie wurde von American Type Culture Collection (ATCC No. CRL2193) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 10 % CO₂ in DMEM Medium (Biochrom) mit 5 % FCS, L-Glutamin, Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Nach Anwachsen und Konfluenz der Zellen wurde die Zellsuspension verdünnt und in 100 µl Aliquots auf 96-Well-Platten ausgesät. Für die cAMP Messung nicht transfizierter Zellen wurden 20000 Zellen pro Well, für die cAMP Bestimmung siRNA transfizierter Zellen 5000 Zellen je Well ausgesät.

Vor Transfektion mit siRNA wurden die As4.1-Zellen 24 Stunden kultiviert. Die für die murine AC5 spezifische siRNA (AC5, XM_156060) und die für die murine AC6 spezifische siRNA (AC6, NM_007405) wurde je als Gemisch von vier unabhängigen siRNAs von Dharmacon bezogen. Eine Mischung unspezifischer siRNAs diente als Negativkontrolle (Dharmacon). Für die Transfektion wurde DharmaFECT transfection Reagent No.2 (Dharmacon) nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach 72 Stunden wurde das Transfektionsmedium entfernt und 100 µl vorgewärmtes Medium mit den entsprechenden aktiven Substanzen zugegeben und die Zellen für 4 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellüberstände entfernt und die Zellen für die cAMP Bestimmung mit 100 µl 0,1 M Salzsäure pro Well lysiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der Reninsekretionsrate konnte weder durch Forskolin, noch durch Isoproterenol eine reproduzierbare Stimulation der Reninsekretion bei Inkubation über 4

Stunden erreicht werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit der Stammlösung der aktiven Substanz für vier Stunden (Forskolin) bzw. sechs Stunden (Isoproterenol) vorstimuliert. Im Anschluss daran wurde das Medium entfernt und 100 µl vorgewärmtes Medium mit den entsprechenden aktiven Substanzen zugegeben. Nach weiteren vier Stunden (76 Stunden nach Beginn der Transfektion) wurde das Medium und die Zellen wie für die JG-Zellen beschrieben geerntet.

2.2.2. Immunologische Methoden

2.2.2.1. Messung der Reninsekretion

Um die Reninsekretionsrate der kultivierten JG-Zellen zu ermitteln, musste die Reninaktivität des Extrazellularraumes und des Intrazellularraumes, im Versuchsmodell also die Aktivität des Zellüberstandes und des Zelllysates, zunächst getrennt voneinander bestimmt werden. Wie bereits unter Punkt 1.1. erläutert, katalysiert die Peptidase Renin die hydrolytische Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Plasma binephrektomierter Ratten enthält supraphysiologisch hohe Konzentrationen an Angiotensinogen und wird deswegen als „Reninsubstrat“ bezeichnet. Inkubiert man eine Probe unbekannter Reninaktivität mit „Reninsubstrat“, so ist Menge des enzymatisch gebildeten Angiotensin I ausschließlich von der Reninaktivität in der Probe abhängig. Die Konzentration des entstandenen Angiotensin I kann wiederum mittels Radioimmunoassay (DiaSorin) bestimmt werden. Dazu muss die Probe zunächst in anti-Angiotensin I-Antikörper beschichtete Röhrchen transferiert und darin mit einer definierten Menge an radioaktiv markiertem Angiotensin I Tracer gemischt werden. Dem Prinzip eines Immunoassays folgend, konkurrieren während der anschließenden Inkubationszeit einerseits radioaktiv markiertes und andererseits natürliches, durch die Reninaktivität der ursprünglichen Probe gebildetes, Angiotensin I kompetitiv um die Bindungsstellen der Antikörper. Hat sich ein Gleichgewicht eingestellt, sind markierte und unmarkierte Angiotensin I-Moleküle im selben Verhältnis wie in der Probenlösung an die immobilisierten Antikörper gebunden. Nach Entfernen des Lösungsgemisches ist der Anteil radioaktiv markierter an den insgesamt gebundenen Angiotensin I-Molekülen und damit die Strahlungsaktivität des Röhrchens reziprok mit der Reninaktivität der ursprünglichen Probe verknüpft. Durch Erstellen einer Eichkurve mit Vergleichsproben bekannter Aktivität kann schließlich auf die Reninaktivität der eigentlichen Probe

zurückgeschlossen werden. Die prozentuale Reninsekretionsrate der Zellen errechnet sich dann als Anteil der Reninaktivität im Zellüberstand an der Gesamt-Reninaktivität des Wells (Summe aus der Reninaktivität im Zelllysate und der Reninaktivität im Zellüberstand).

$$\text{Reninsekretion} = \frac{\text{Reninaktivität im Zellüberstand}}{\text{Reninaktivität im Zellüberstand} + \text{Reninaktivität im Zelllysate}} \times 100 [\%]$$

Im Detail wurde diese Bestimmung wie folgt durchgeführt: Zuerst wurden die Proben von Zellüberstand und Zelllysate je 1:12,5 mit Maleatpuffer verdünnt und 10 µl der Verdünnung auf Eis mit 5,6 µl RIA-Reaktionspuffer, 4,4 µl Reninsubstrat und 1 µl PMSF gemischt. Dieser Ansatz wurde für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und die Reaktion dann auf Eis gestoppt. Anschließend wurde das gesamte Reaktionsgemisch in anti-Angiotensin I-Antikörper beschichtete Röhrchen transferiert, dort mit 500 µl ¹²⁵Iod-markierten Angiotensin I Tracer gemischt und für 3 - 24 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung sorgfältig aus den Röhrchen abgesaugt und die Strahlungsaktivität im Gamma-Zähler für 60 s gemessen. Die Reninaktivität der Ausgangsprobe errechnete sich dann durch Vergleich mit der im selben Versuchsansatz ermittelten Eichkurve.

Da bekannt ist, dass As4.1-Zellen Renin zum überwiegenden Teil (95 %) in seiner inaktiven Vorstufe Prorenin sezernieren, wurde, um die Reninsekretion dieses Zelltyps zu bestimmen, sowohl intrazelluläres als auch sezerniertes Prorenin nach einem Protokoll von Sigmund et al. (1990) mit Trypsin aktiviert. Die Bestimmung der Reninsekretionsrate erfolgte wie für die JG-Zellen beschrieben.

2.2.2.2. Bestimmung des cAMP-Gehaltes

Der cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen wurde mit einem cAMP-ELISA (Assay Designs) als Stoffmenge cAMP pro Well bestimmt und nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.3. Proteinnachweis mittels Western-Blot

Die Proteinexpression der Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 in As4.1-Zellen wurde mit Hilfe der Western-Blot-Technik analysiert. Dazu wurde zuerst das Gesamtprotein aus Zelllysaten von 5 Wells extrahiert und gepoolt. Diese Eiweißprobe wurde mit 5 µg pro Spur auf einem 7 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, aufgetrennt

und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Bio-Rad, München). Der Blot wurde dann bei 4 °C über Nacht geblockt und darauf folgend zuerst 2,5 Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (anti-AC5; 1:250; PAC-501AP; FabGennix Inc.) und danach 45 min bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Hase IgG; 1:5000; Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Die Detektion der spezifischen Anfärbung erfolgte mittels Chemolumineszenz (enhanced chemiluminescence; Amersham). Abschließend wurden die Proteinbanden densitometrisch quantifiziert. Für die Detektion des Bezugsproteins β -Aktin (monoklonaler Maus-Antikörper; 1:5000; Sigma) wurden 2,5 μ g Gesamtprotein pro Spur analysiert.

Die Antikörper gegen die Isoform AC6 (PAC-601AP FabGennix Inc.; ab14781 Abcam) produzierten in Gesamtproteinextrakten aus Niere, Gehirn und As4.1-Zellen jeweils keine spezifische Bandenfärbung im Bereich des zu erwartenden Molakulargewichtes.

2.2.3. Gentechnische Methoden

2.2.3.1. Gesamt-RNA Isolation aus eukaryontischen Zellen

Die Isolation von juxtaglomerulären Zellen wurde nach dem unter Punkt 2.2.1.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Für die Expressionsanalyse von Adenylatzyklaseisoformen auf mRNA-Ebene in JG-Zellen wurden fünf unabhängige Präparationen (Fünf C57BL/6 Mäuse beiderlei Geschlechts) angefertigt. Unmittelbar nach Entnahme der Nieren zur Gewinnung der JG-Zellen wurden die Bauchaortae des jeweils selben Tieres isoliert. Das umgebende Fettgewebe wurde unter einem Stereomikroskop entfernt, die Aortae längs aufgeschnitten und das Endothel mit einer Skalpellklinge abgeschabt. Alle Arbeitsschritte wurden in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Bis zur RNA-Isolation wurde das gewonnene Aortengewebe in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Gesamtzeit von der Entnahme der Aorta bis zur Lagerung in flüssigem Stickstoff betrug 15 min.

Die Isolation von Gesamt-RNA aus JG-Zellen, Aortengewebe und As4.1-Zellen erfolgte schließlich nach dem Guanidinium-Phenol-Chloroform Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen ist unter Punkt 2.1.3. aufgeführt.

2.2.3.2. Bestimmung der mRNA Expression in eukaryontischen Zellen

Für die Reverse Transkription (RT) wurde die gewonnene RNA in 9 µl DEPC-H₂O gelöst, mit 1 µl Oligo(dT)₁₅ Primer (0,5 µg/µl) gemischt, für 5 min bei 65 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Zu dem Reaktionsgemisch wurden dann 1 µl Reverse Transkriptase (100 U), 4 µl dNTPs (2,5 mM) und 4 µl first strand Puffer zugegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte bei 37 °C für 1 Stunde. Daran anschließend wurde die Reverse Transkriptase bei 94 °C für 2 min inaktiviert.

Die RT-PCR wurde standardmäßig mit einem Ansatz von 11 µl H₂O, 2 µl dNTPs (2,5 mM), 2 µl PCR-Puffer (invitrogen), 0,7 µl MgCl₂ (invitrogen), 0,2 µl Taq (invitrogen), 2 µl cDNA aus oben beschriebener RT und je 1 µl des 5' und des 3' Primers (je 10 pM) durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte bei 36 Zyklen mit 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Annealing bei 60 °C und 1 min Elongation bei 72 °C. Als Negativkontrolle dienten Proben ohne das Reverse Transkriptase Enzym. Die PCR-Produkte wurden auf 2 % Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen analysiert.

Die semiquantitative Bestimmung der mRNA Expression von AC5 und AC6 erfolgte an cDNA von unspezifisch und spezifisch für AC5 und/oder AC6 transfizierten As4.1-Zellen mittels RT-PCR im Light Cycler (Roche) mit dem Light Cycler DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Molecular Biochemicals). Pro Ansatz wurden 2 µl cDNA, 3,0 mM MgCl₂, je 1 pmol des 5' und des 3' Primers und 2 µl des Fast Starter Mix (Puffer, dNTPs, SYBR Green, Taq) eingesetzt. Das Amplifikationsprogramm im Light Cycler bestand aus 1 Zyklus 95 °C für 10 min gefolgt von 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 15 s, Annealing bei 60 °C für 5 s und Elongation bei 72 °C für 15 s. Die Verifikation der spezifischen und korrekten Amplifikation erfolgte mittels Schmelzkurve und Analyse der PCR-Produkte auf 2 % Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen.

2.2.4. Statistik

Für jedes Versuchsprotokoll wurden drei bis fünf unterschiedliche Zellpräparationen angefertigt. In jedem Einzelexperiment zur Reninfreisetzung oder zum cAMP-Gehalt der Zellen wurden jeder Bedingung vier Wells zugeteilt. Deswegen repräsentiert jeder Messpunkt 12 bis 20 Einzelmessungen und ist jeweils als arithmetisches Mittel ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Unterschied zwischen zwei

Gruppen wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche bestimmt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Anzahl der Einzelerperimente einer Versuchsreihe wurde mit „N“ bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Adenylatzyklaseisoformen in JG-Zellen

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Rolle von Adenylatzyklasen für die Kurzzeitregulation der Reninsekretion. Daher sollte zunächst bestimmt werden, welche Isoformen in JG-Zellen auf mRNA-Ebene vorhanden sind.

In Anbetracht der Tatsache, dass JG-Zellen eng mit glatten Gefäßmuskelzellen verwandt sind, wurde als Vergleichsgewebe aufbereitetes Aortengewebe (siehe Punkt 2.2.2.1) mituntersucht. Mittels RT-PCR wurden cDNA Proben von JG-Zellen und glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta auf ihr Expressionmuster von Adenylatzyklasen-mRNA überprüft. Dazu wurden die unter Punkt 2.1.1. erwähnten und in Vorversuchen auf ihre Spezifität getesteten Primerpaare eingesetzt. Die Isoformen AC2 und AC7 konnten weder in Aortengewebe, noch in JG-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen die Isoformen AC3 und AC8 nur in Aortengewebe amplifiziert wurden. Die Isoformen AC1, AC4, AC5, AC6 und AC9 konnten demgegenüber in beiden untersuchten Zelltypen detektiert werden (Abb. 3.1). Die Negativkontrollprobe ohne das Reverse Transkriptase-Enzym zeigte jeweils keine spezifische Amplifizierung (nicht gezeigt).

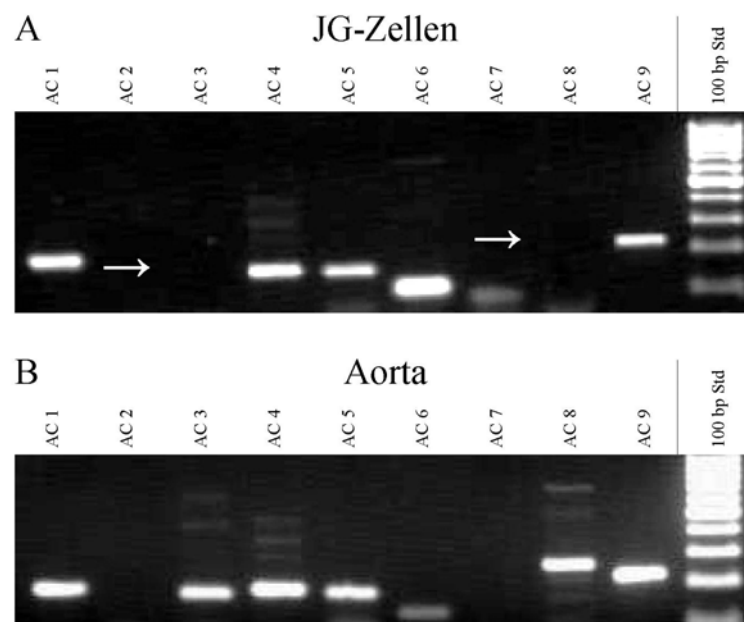


Abb. 3.1 Expression von Adenylatzyklase Isoformen in JG-Zellen (A) und Aorta (B). AC1-9 Adenylatzyklasen 1-9; 100 bp Std DNA Molekulgewichtstandard; Kleine weiße Pfeile (→) deuten die erwartete Lage der Banden für AC 2 und AC 7 an; Die PCR-Produkte wurden auf 2 % Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen aufgetragen.

Für das weitere Vorgehen konnte folglich insbesondere die Expression der kalziumhemmbaren Isoformen AC5 und AC6 und darüber hinaus noch der Isoformen AC1, AC4 und AC9 in JG-Zellen festgehalten werden. Interessanterweise werden in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta daneben noch AC3 und AC8 exprimiert.

3.2. Experimente an isolierten JG-Zellen

3.2.1. Modulation des Kalziumgehaltes

Wie in Abb. 1.3 dargestellt, ist ein Einfluss von Kalzium auf den cAMP-Gehalt und damit eventuell auch auf die Reninsekretion aus JG-Zellen über verschiedene Mechanismen denkbar. Da für die Wirkungsweise einer zytosolischen Kalziumkonzentrationszunahme nicht nur ihr Absolutwert, sondern auch der Mechanismus ihrer Generierung eine Rolle spielen könnte, wurden in den folgenden Experimenten an isolierten JG-Zellen verschiedene Substanzen zur Anhebung des Kalziumgehaltes in den JG-Zellen benutzt. Zum einen wurde mit **Thapsigargin** die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase gehemmt, was zu einer Entleerung zellulärer Kalziumspeicher und konsekutiv zum Kalziumeinstrom über calcium release activated calcium channels (CRAC) führt (Schweda und Kurtz, 2004). Daneben wurde **Endothelin-1** eingesetzt, ein Vasokonstriktor, der sowohl über den Phospholipase C – Signalweg zur intrazellulären Kalziummobilisierung führt, bei dem aber auch ein extrazellulärer Kalziumeinstrom eine Rolle zu spielen scheint (Ritthaler et al., 1995). Schließlich kam auch noch der physiologische Feedbackregulator des RAAS **Angiotensin II** zum Einsatz, der auch über den Phospholipase C - Weg eine Kalziummobilisierung bewirkt (Schweda und Kurtz, 2004). Für alle drei genannten Substanzen ist eine kalziumvermittelte, inhibierende Wirkung auf die Reninfreisetzung aus JG-Zellen gut belegt.

In einer ersten Versuchsreihe sollte der Einfluss von Kalzium auf die basale Reninsekretionsrate untersucht werden. Um die Kurzzeitregulation der Reninsekretion experimentell möglichst gut nachstellen zu können, wurden in diesem und in den folgenden Experimenten die isolierten JG-Zellen nach Kultivierung jeweils für nur über einen Zeitraum von vier Stunden stimuliert. Im Vergleich zur Kontrolle (Medium) mit

einer Reninsekretion (Reninaktivität im Überstand durch Gesamtreninaktivität des Wells) von $11,07 \pm 0,70$ % zeigte sich im Mittel aus vier Versuchen sowohl bei Stimulation mit Thapsigargin $1 \mu\text{M}$ ($10,07 \pm 0,80$ %), Angiotensin II $1 \mu\text{M}$ ($10,69 \pm 0,59$ %) als auch mit Endothelin-1 10 nM ($10,43 \pm 0,73$ %) keine signifikante Änderung der Reninfreisetzungsrates (Abb. 3.2). Ein Einfluss einer intrazellulären Kalziumkonzentrationserhöhung auf die basale Reninsekretionsrate aus JG-Zellen konnte somit nicht nachgewiesen werden.

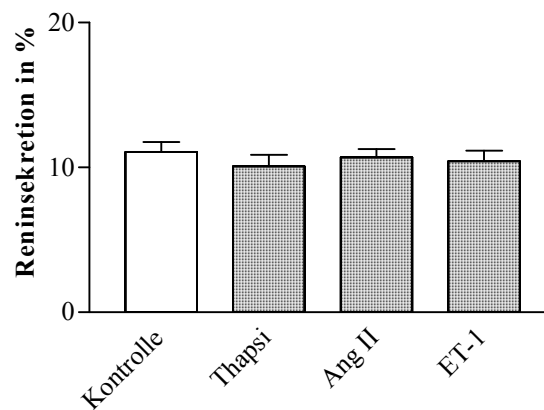


Abb. 3.2 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf die Reninsekretionsrate in isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Thapsi* Thapsigargin ($1 \mu\text{M}$), *Ang II* Angiotensin II ($1 \mu\text{M}$), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten.

3.2.2. Unspezifische Aktivierung von Adenylatzyklen

Im nächsten Schritt sollte nun der Einfluss von Kalzium auf die Reninsekretionsrate bei unspezifischer Aktivierung von Adenylatzyklen durch Forskolin untersucht werden. Forskolin aktiviert, möglicherweise mit Ausnahme von AC9, alle Adenylatzyklen in Säugern durch Bindung und Wirkung an einer hydrophoben Tasche auf der Oberfläche der katalytischen Domänen der Adenylatzyklen (Defer et al., 2000). Durch Forskolin lässt sich also eine direkte und unspezifische Stimulation aller Adenylatzyklen in den JG-Zellen erreichen. Um in den Experimenten eine maximale Stimulation der Reninsekretion zu erreichen, wurde in Vorversuchen zunächst mit einer Konzentrationsreihe die geringste Konzentration, bei der Forskolin die Reninsekretion im Vergleich zur Kontrolle maximal steigert ($5 \mu\text{M}$), bestimmt. Der Einfluss von Kalzium auf die Reninfreisetzung wurde durch Kombination von Forskolin mit den

vorher genannten Substanzen Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle ($12,01 \pm 1,11$ %) zeigte sich bei $N = 4$ Versuchen eine Stimulation der Reninsekretionsrate durch Forskolin $5 \mu\text{M}$ auf etwa den doppelten Wert ($22,46 \pm 1,76$ %). Diese Sekretionszunahme konnte durch alle drei kalziummobilisierenden Substanzen (Thapsigargin $1 \mu\text{M}$, $16,66 \pm 1,39$ %; Angiotensin II $1 \mu\text{M}$, $16,93 \pm 1,28$ %; Endothelin-1 10 nM , $16,67 \pm 1,51$ %) auf etwa die Hälfte abgeschwächt werden (Abb. 3.3).

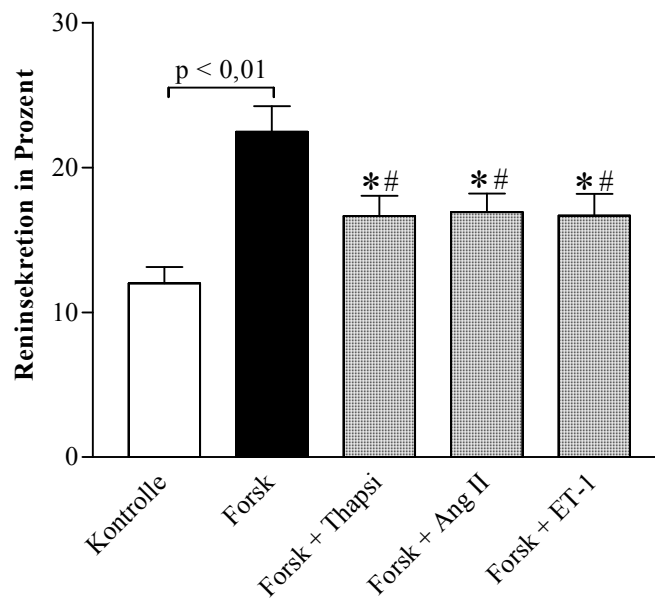


Abb. 3.3 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf die durch Forskolin stimulierte Reninsekretionsrate in isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* Forskolin ($5 \mu\text{M}$), *Thapsi* Thapsigargin ($1 \mu\text{M}$), *Ang II* Angiotensin II ($1 \mu\text{M}$), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,05$ gegenüber Forskolin.

Nachdem vermutlich die durch Forskolin ausgelöste intrazelluläre cAMP-Erhöhung zu einer Verdopplung der Reninfreisetzung geführt hat, welche wiederum durch Kalzium hemmbar war, sollte als Nächstes der cAMP-Gehalt der JG-Zellen unter denselben Stimulationsbedingungen genauer betrachtet werden.

Bei Stimulation der JG-Zellen für vier Stunden mit Forskolin $5 \mu\text{M}$ stieg der cAMP-Gehalt pro Well gegenüber der Kontrolle ($56,2 \pm 11,4 \text{ fmol / Well}$) auf etwa den zehnfachen Wert ($568,5 \pm 35,5 \text{ fmol / Well}$) an. Analog zu den Messungen der Reninsekretion wurde diese Zunahme durch Thapsigargin $1 \mu\text{M}$ ($340,1 \pm 63,2 \text{ fmol / Well}$), Angiotensin II $1 \mu\text{M}$ ($361,4 \pm 62,5 \text{ fmol / Well}$) und Endothelin-1 10 nM ($349,6 \pm 55,4 \text{ fmol / Well}$) wieder auf etwa die Hälfte reduziert (Abb. 3.4).

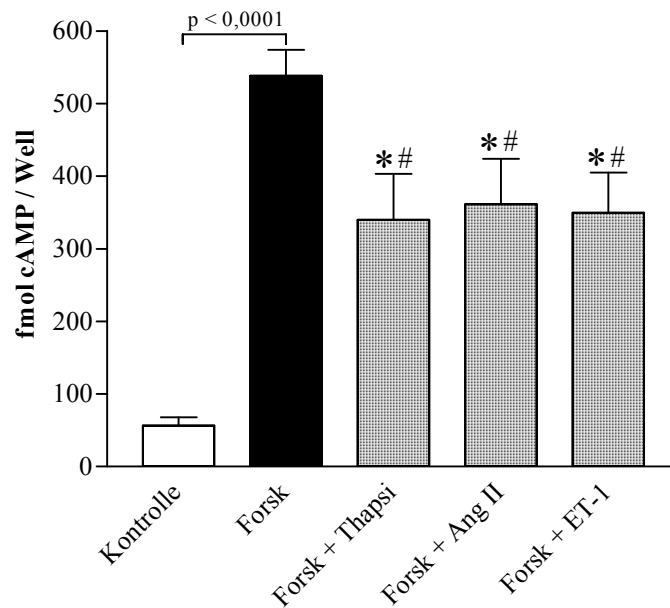


Abb. 3.4 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf den durch Forskolin stimulierten cAMP-Gehalt von isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* Forskolin (5 μ M), *Thapsi* Thapsigargin (1 μ M), *Ang II* Angiotensin II (1 μ M), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; * p < 0,05 gegenüber der Kontrolle, # p < 0,01 gegenüber Forskolin.

Insgesamt lässt sich also eine gleichsinnige und sich darüber hinaus in ihrem Ausmaß entsprechende Veränderung von zytosolischer cAMP-Konzentration und Reninsekretion bei den beschriebenen Stimulationsmanövern beobachten. Dies bestätigt einerseits eine direkte Verknüpfung des cAMP-Spiegels mit der Reninfreisetzung und legt andererseits einen Einfluss von Kalzium auf die cAMP-Signalkaskade durch Verminderung des zytosolischen cAMP-Gehaltes nahe.

3.2.3. Unspezifische Hemmung von Phosphodiesterasen

Nachdem die festgestellten Veränderungen der Reninsekretion offensichtlich gleichsinnig mit dem intrazellulären cAMP-Gehalt verknüpft sind, muss man sich fragen, ob Kalzium seine Wirkung auf diesen Prozess vielleicht über Aktivierung cAMP abbauender Phosphodiesterasen (PDE) vermittelt. Ein potenter unspezifischer Inhibitor von PDE ist 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX). Durch den verminderten Abbau kommt es in der Zelle bei Applikation von IBMX zu einem Anstieg der cAMP-

Konzentration. Dass PDE für die Regulation der Reninfreisetzung eine Rolle spielen, wurde schon mehrmals beschrieben (Chiu und Reid, 1996; Chiu et al., 1996; Chiu et al., 1999). Im Hinblick auf einen möglichen Kalziumeinfluss ist in diesem Zusammenhang natürlich die kalziumaktivierbare Isoform PDE-1 von Interesse.

Um einen Vergleich mit dem vorangehenden Versuchsaufbau (Punkt 3.2.2.) zu haben, wurde als interne Kontrolle eine Stimulation durch Forskolin 5 μM mituntersucht. Dabei ergab sich bei $N = 4$ Versuchen eine Stimulation der Reninsekretionsrate durch IBMX 100 μM auf etwas über den doppelten Kontrollwert (Von $11,74 \pm 1,21$ % auf $26,62 \pm 2,84$ %). Diese Stimulation konnte wiederum durch die kalziummodulierenden Stoffe Thapsigargin 1 μM ($16,96 \pm 1,45$ %), Angiotensin II 1 μM ($18,17 \pm 1,93$ %) und Endothelin-1 10 nM ($15,85 \pm 1,03$ %) auf etwa die Hälfte gesenkt werden. Forskolin 5 μM ($18,17 \pm 1,93$ %) verdoppelte wie schon im vorhergehenden Versuch die Reninsekretionsrate (Abb. 3.5).

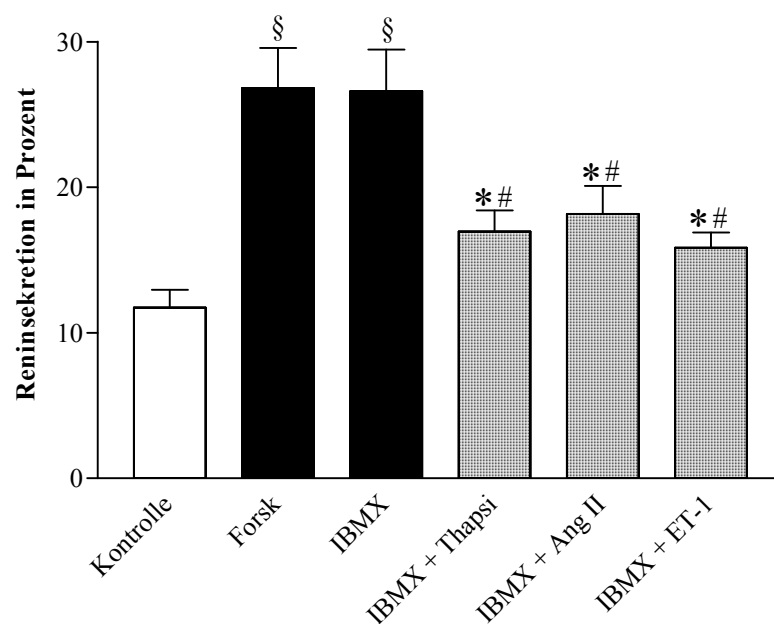


Abb. 3.5 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf die durch IBMX stimulierte Reninsekretionsrate in isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* Forskolin (5 μM), *IBMX* 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μM), *Thapsi* Thapsigargin (1 μM), *Ang II* Angiotensin II (1 μM), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; § $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,05$ gegenüber IBMX.

Die anschließende Bestimmung der cAMP-Konzentrationen zeigte, dass auch hier die prozentualen Änderungen der Reninsekretion mit im Ausmaß entsprechenden Änderungen der cAMP-Konzentrationen einhergehen: Die Behandlung der JG-Zellen

mit IBMX 100 μM hob die Stoffmenge cAMP pro Well auf etwa den zehnfachen Ausgangswert der Kontrolle (Von $41,5 \pm 14,9$ fmol / Well auf $413,0 \pm 52,6$ fmol / Well; Forskolin 5 μM : $476,3 \pm 75,7$ fmol / Well). Analog der Reninsekretionsexperimente wurde diese Stimulation durch Thapsigargin 1 μM ($194,2 \pm 8,5$ fmol / Well), Angiotensin II 1 μM ($212,3 \pm 23,8$ fmol / Well) und Endothelin-1 10 nM ($185,6 \pm 15,2$ fmol / Well) auf etwas weniger als die Hälfte reduziert (Abb. 3.6).

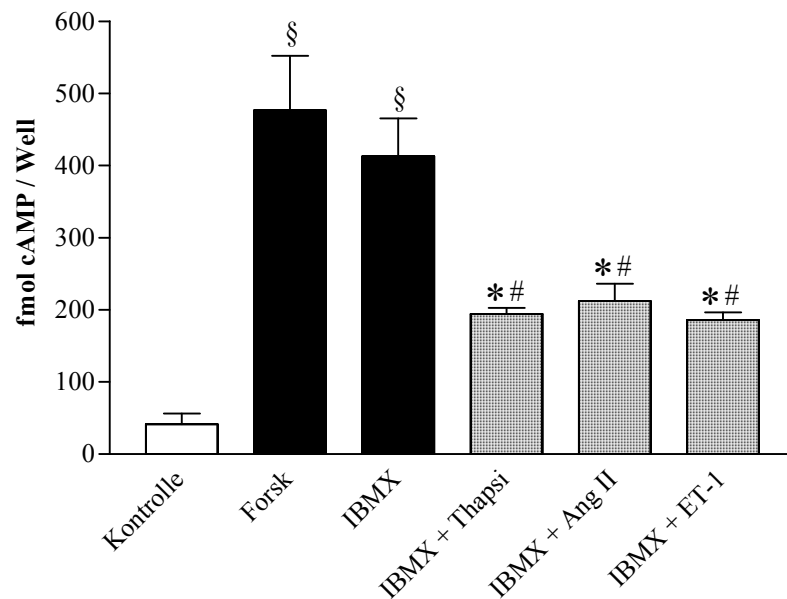


Abb. 3.6 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf den durch IBMX stimulierten cAMP-Gehalt von isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. Forsk Forskolin (5 μM), IBMX 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μM), Thapsi Thapsigargin (1 μM), Ang II Angiotensin II (1 μM), ET-1 Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; § $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,05$ gegenüber IBMX.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die pharmakologische Blockade der PDE sowohl zum Anstieg von cAMP-Konzentration in der Zelle als auch zur Steigerung der Reninsekretion führt. Diese Effekte sind kalziumabhängig durch die verschiedenen oben genannten Substanzen hemmbar, wobei sich eine Proportionalität zwischen cAMP-Gehalt und Reninausschüttung der JG-Zellen zeigt, die den Ergebnissen der vorangehenden Versuchsreihe mit Forskolinstimulation entspricht. Da unter IBMX die verschiedenen PDE-Isoformen potent blockiert werden, ist die Möglichkeit der kalziumabhängigen Aktivierung der PDE-1 nicht mehr anzunehmen. Deswegen ist die Veränderung des cAMP-Gehaltes nicht durch einen verstärkten Abbau durch PDE

erklärbar und Kalzium müsste seine Wirkung entweder an Adenylatzyklasen oder direkt am cAMP-Molekül entfalten, was im Folgenden näher beleuchtet werden soll.

3.2.4. Stimulation mittels eines cAMP-Analogons

Sowohl Forskolin als auch IBMX führen in ihrer Wirkungsweise konsekutiv zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle. Zweck der nachfolgenden Versuchsreihe war deshalb einen direkten Einfluss von cAMP selbst oder einem möglichst ähnlichen Analogon auf die Reninsekretion zu testen. Dabei stellte sich einerseits das Problem durch eine gute Membranpermeabilität des Stoffes eine ausreichende Aufnahme des cAMP-Analogons in die Zelle zu gewährleisten und andererseits intrazellulär eine ausreichende Konzentration des Stoffes zu generieren. Gängige cAMP-Analoga wie etwa Dibutyryl-cAMP oder 8-Bromo-cAMP sind zwar besser membrangängig als natives cAMP, bringen aber den Nachteil mit sich, dass sie in der Zelle eine unphysiologisch erhöhte Stabilität gegenüber der Hydrolyse durch PDE haben und dadurch ein verändertes Wirkprofil besitzen. Demgegenüber kann durch die Einführung einer Acetoxymethylestergruppe (AM) am Phosphatrest des cAMP eine intrazelluläre Generierung von nativem cAMP erreicht werden. Die AM-Gruppe erhöht die Membrangängigkeit von cAMP und erleichtert dadurch die Aufnahme in die kultivierte Zelle. Esterasen hydrolysieren intrazellulär dann rasch die Esterverbindung und es entsteht cAMP, welches wiederum eine geringe Membrangängigkeit besitzt und sich so in der Zelle anreichert (Bartsch et al., 2003). Darüber hinaus besitzt cAMP/AM auch noch eine höhere Wirkpotenz als Dibutyryl-cAMP und 8-Bromo-cAMP (Schultz et al., 1994), wobei aber die natürliche Abbaukinetik durch PDE erhalten bleibt. Damit eine ausreichende Aufnahme von cAMP/AM in die kultivierten Zellen erreicht werden konnte, wurde das Stimulationsmedium zusätzlich zum Lösungsmittel DMSO (0,1 Vol.-%) mit dem Detergenz Pluronic 127 (0,01 Vol.-%) versetzt. In Vorversuchen wurde zunächst ein Lösemiteleinfluss von DMSO und Pluronic in Kombination auf die Reninsekretion ausgeschlossen. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ($13,36 \pm 0,83$ %) bei $N = 4$ Versuchen sowohl bei Zugabe von 0,01 Vol.-% Pluronic ($13,96 \pm 1,57$ %), als auch bei Kombination von 0,01 Vol.-% Pluronic mit 0,1 Vol.-% DMSO ($14,07 \pm 1,39$ %) kein signifikanter Unterschied in der Reninsekretionsrate.

Bei Applikation des cAMP-Analogons cAMP/AM kam es im Mittel aus vier Versuchen gegenüber der Kontrolle mit 0,01 Vol.-% Pluronic und 0,1Vol.-% DMSO ($14,07 \pm 1,39$ %) zu einer deutlichen Erhöhung der Reninsekretionsrate (cAMP/AM 250 μ M: $24,83 \pm 1,40$ %), die mit derjenigen von Forskolin 5 μ M ($24,11 \pm 1,59$ %) als interner Kontrolle vergleichbar war. Diese Zunahme konnte durch keinen der Kalziumliberatoren Thapsigargin 1 μ M ($23,65 \pm 1,84$ %), Angiotensin II 1 μ M ($25,13 \pm 1,40$ %) und Endothelin-1 10 nM ($24,41 \pm 1,76$ %) signifikant gesenkt werden (Abb. 3.7).

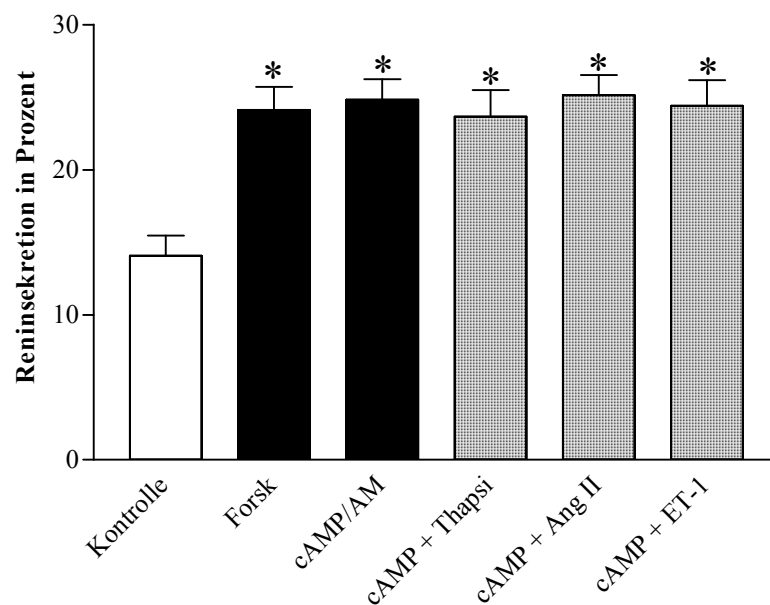


Abb. 3.7 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf die durch cAMP/AM stimulierte Reninsekretionsrate in isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* Forskolin (5 μ M), *cAMP/AM* und *cAMP* Acetoxymethyl-cAMP (250 μ M), *Thapsi* Thapsigargin (1 μ M), *Ang II* Angiotensin II (1 μ M), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; * $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

Um zu untersuchen, welche cAMP-Konzentrationen durch die Stimulation mit cAMP/AM in den kultivierten Zellen erreicht werden und ob sich diese unter dem Einfluss von Kalzium verändern, wurde auch hier eine Bestimmung des cAMP-Gehaltes an die Messung der Reninfreisetzungsratesrate angeschlossen.

Unter denselben Versuchsbedingungen wie bei der Analyse der Reninsekretionsrate stieg die Stoffmenge cAMP im Zelllysat pro Well im Vergleich zur Kontrolle ($43,6 \pm 11,0$ fmol / Well) bei N = 4 Versuchen unter Zugabe von cAMP/AM 250 μ M ($536,7 \pm 68,7$ fmol / Well) nicht signifikant unterschiedlich zur Vergleichsprobe mit Forskolin 5 μ M ($551,7 \pm 78,0$ fmol / Well). Diese Erhöhung der cAMP-Stoffmenge je Well wurde unter dem Einfluss Thapsigargin 1 μ M ($496,7 \pm 79,0$ fmol / Well), Angiotensin II 1 μ M

($480,0 \pm 82,0$ fmol / Well) und Endothelin-1 10 nM ($493,2 \pm 77,2$ fmol / Well) ebenfalls nicht mehr signifikant verändert (Abb. 3.8).

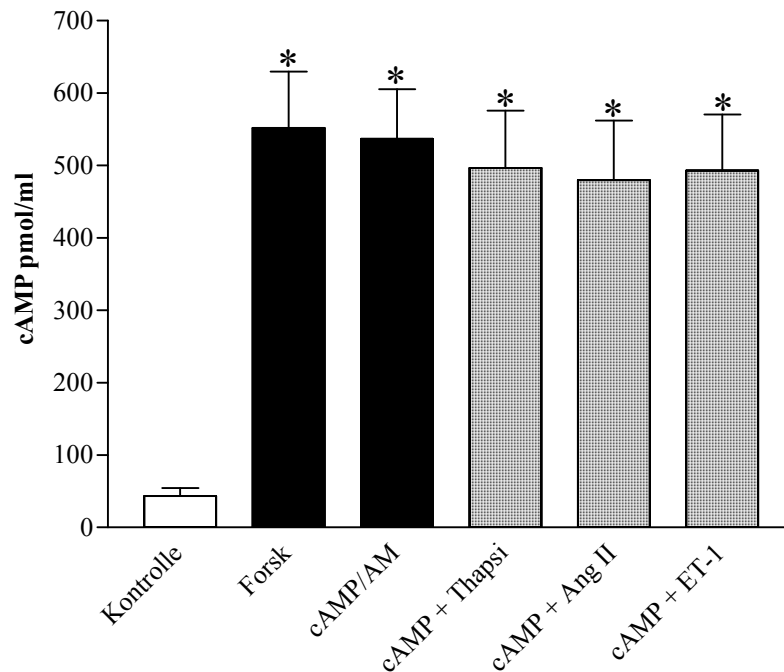


Abb. 3.8 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf den durch cAMP/AM stimulierten cAMP-Gehalt von isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* Forskolin (5 μ M), *cAMP/AM* und *cAMP* Acetoxymethyl-cAMP (250 μ M), *Thapsi* Thapsigargin (1 μ M), *Ang II* Angiotensin II (1 μ M), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; * $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

Abschließend kann man festhalten, dass bei einer extrazellulären Konzentration von 250 μ M cAMP/AM ein intrazellulärer cAMP-Gehalt erreicht wurde, der in etwa dem bei maximal effektiver Forskolinstimulation entsprach. Durch Kalziummobilisierung in den Zellen ließ sich diese cAMP-Konzentration nicht signifikant beeinflussen. Da Reninsekretionsrate und cAMP-Gehalt sich gleichsinnig verhalten, ist anzunehmen, dass Kalzium seinen Einfluss auf die Reninfreisetzung durch Wirkung an dem in der Signalkette der cAMP-Wirkung vorgeschalteten Schritt, also der durch Adenylatzyklen katalysierten cAMP-Bildung, entfaltet und ein gesteigerter cAMP-Abbau durch PDE keine Rolle spielt.

3.2.5. Spezifische Stimulation am β -Adrenozeptor

In Anbetracht der Ergebnisse der bisherigen Versuche war das nächste Ziel eine möglichst physiologische Form der Aktivierung von Adenylatzyklen zu erreichen. Im Signaltransduktionsmechanismus der cAMP-Kaskade wird die Aktivität von Adenylatzyklen durch G-Proteine reguliert, welche selbst wiederum durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche gesteuert werden. Dieser Prozess stellt die physiologische Form der Aktivierung von Adenylatzyklen dar. Aufgrund der Tatsache, dass in JG-Zellen besonders stark G-Protein gekoppelte β -Adrenozeptoren exprimiert werden, wurde also der Einfluss einer β -adrenergen Stimulation untersucht werden. Ein β -Adrenozeptor Agonist für den gut belegt ist, dass er sowohl in vivo als auch in vitro die Rate der Reninsekretion steigert, ist Isoproterenol (Hackenthal et al., 1990; Kurtz und Wagner, 1999). Aus dem Modell der isoliert perfundierten Niere ist überdies bekannt, dass sowohl Angiotensin II als auch Thapsigargin die durch Isoproterenol stimulierte Reninfreisetzung hemmen können (Schweda und Kurtz, 2004). Vor dem Hintergrund dieser Vorbefunde und mit dem Ziel eine rezeptorvermittelte und damit möglichst physiologisch Form der Aktivierung von Adenylatzyklen zu erreichen, wurden die Auswirkungen von Isoproterenol auf Reninsekretionsrate und cAMP-Gehalt in kultivierten JG-Zellen untersucht.

Die G-Protein gekoppelte Aktivierung von Adenylatzyklen durch Isoproterenol 100 nM hob im Vergleich zur Kontrolle ($10,34 \pm 1,16$ %) die Reninsekretionsrate auf etwas weniger als den doppelten Wert ($17,62 \pm 0,90$ %) an. Diese Steigerung entsprach in dieser Versuchsreihe etwa der durch Forskolin 5 μ M erreichten Stimulation ($18,21 \pm 1,53$ %) und unterschied sich von dieser nicht signifikant. Die Sekretionszunahme infolge der Applikation von Isoproterenol wurde durch Zugabe von kalziummobilisierenden Substanzen (Thapsigargin 1 μ M, $10,73 \pm 1,32$ %; Angiotensin II 1 μ M, $11,09 \pm 0,91$ %; Endothelin-1 10 nM, $10,95 \pm 1,70$ %) vollständig auf etwa den Ausgangswert der Kontrolle gesenkt. Zwischen diesen Werten und dem Kontrollwert bestand kein signifikanter Unterschied (Abb. 3.9).

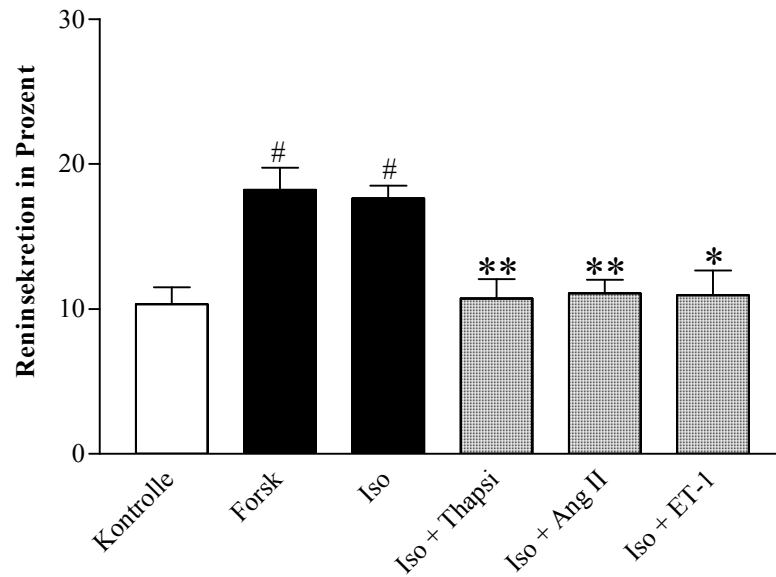


Abb. 3.9 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf die durch Isoproterenol stimulierte Reninsekretionsrate in isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* Forskolin (5 μ M), *Iso* Isoproterenol (100 nM), *Thapsi* Thapsigargin (1 μ M), *Ang II* Angiotensin II (1 μ M), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; # $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, * $p < 0,05$ gegenüber Isoproterenol, ** $p < 0,01$ gegenüber Isoproterenol.

Wie schon in den vorhergehenden Versuchen veränderte sich auch unter diesen Stimulationsbedingungen der cAMP-Gehalt in gleichsinniger Weise wie die Reninsekretionsrate der kultivierten Zellen. So stieg die Stoffmenge cAMP je Well bei Stimulation mit Isoproterenol 100 nM ($347,0 \pm 73,6$ fmol / Well) auf etwas weniger als der zehnfachen Ausgangswert der Kontrolle ($39,4 \pm 13,3$ fmol / Well). Diese Steigerung unterschied sich nicht signifikant von der Vergleichsbedingung Forskolin 5 μ M ($484,2 \pm 37,0$ fmol / Well). Thapsigargin 1 μ M ($47,2 \pm 16,1$ fmol / Well), Angiotensin II 1 μ M ($47,5 \pm 21,2$ fmol / Well) und Endothelin-1 10 nM ($41,5 \pm 16,5$ fmol / Well) blockierten den Effekt von Isoproterenol 100 nM wiederum vollständig, so dass jeweils kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle mehr bestand (Abb. 3.10).

Die rezeptorvermittelte Stimulation der Reninausschüttung und der cAMP-Bildung wurde also durch alle eingesetzten kalziuserhöhenden Stoffe nicht nur in ihrer Stärke abgeschwächt, sondern vollständig aufgehoben. Diese Ergebnisse lassen somit auf eine spezifische Aktivierung von kalziumhemmbaren Adenylatzyklen durch β -Adrenozeptoren in JG-Zellen und damit eine physiologische Bedeutung dieser Adenylatzyklaseisoformen schließen.

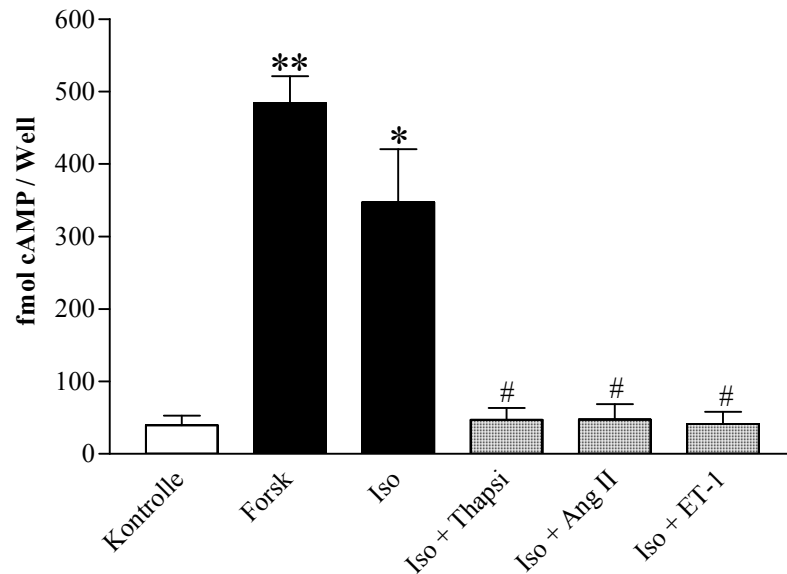


Abb. 3.10 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf den durch Isoproterenol stimulierten cAMP-Gehalt von isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* Forskolin (5 μ M), *Iso* Isoproterenol (100 nM), *Thapsi* Thapsigargin (1 μ M), *Ang II* Angiotensin II (1 μ M), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; * $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, ** $p < 0,0001$ gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,01$ gegenüber der Isoproterenol.

3.2.6. Korrelation von cAMP-Gehalt und Reninsekretion

In der Gesamtbetrachtung der bisherigen Resultate scheinen sich Reninausschüttung und cAMP-Gehalt der JG-Zellen augenscheinlich nicht nur gleichsinnig zu verändern, sondern sich auch in ihrem Ausmaß jeweils zu entsprechen. Deswegen wurden, um eine mögliche Proportionalität zwischen cAMP-Gehalt und Reninsekretionsrate aufzudecken, beide Messparameter aus den bisher durchgeführten Experimenten miteinander korreliert.

Bei der Analyse der Daten der in den Punkten 3.2.2. bis 3.2.5. beschriebenen Versuchsreihen wurden zuerst die Stimulationsmanöver ohne Zusatz kalziummobilisierender Substanzen, im Klartext also die Bedingungen „Kontrolle“, „Forskolin“, „IBMX“, „cAMP/AM“ und „Isoproterenol“, näher betrachtet. Hier ergab sich eine positive Korrelationsbeziehung ($R^2 = 0,7899$) von cAMP-Gehalt und Reninfreisetzungsrates der JG-Zellen (normaler Kalziumgehalt). Diese Korrelationsbeziehung blieb auch unter der Zugabe von Thapsigargin, Angiotensin II oder Endothelin-1 bestehen ($R^2 = 0,8637$; hoher Kalziumgehalt). Darüber hinaus waren

die Ausgleichsgeraden der Korrelationsbeziehungen zwischen normalem und hohem Kalziumgehalt nicht signifikant unterschiedlich, was vermuten lässt, dass Kalzium ausschließlich über eine Hemmung der cAMP-Bildung auf die Reninsekretion wirkt und zusätzliche inhibitorische Effekte keine Bedeutung haben (Abb. 3.11).

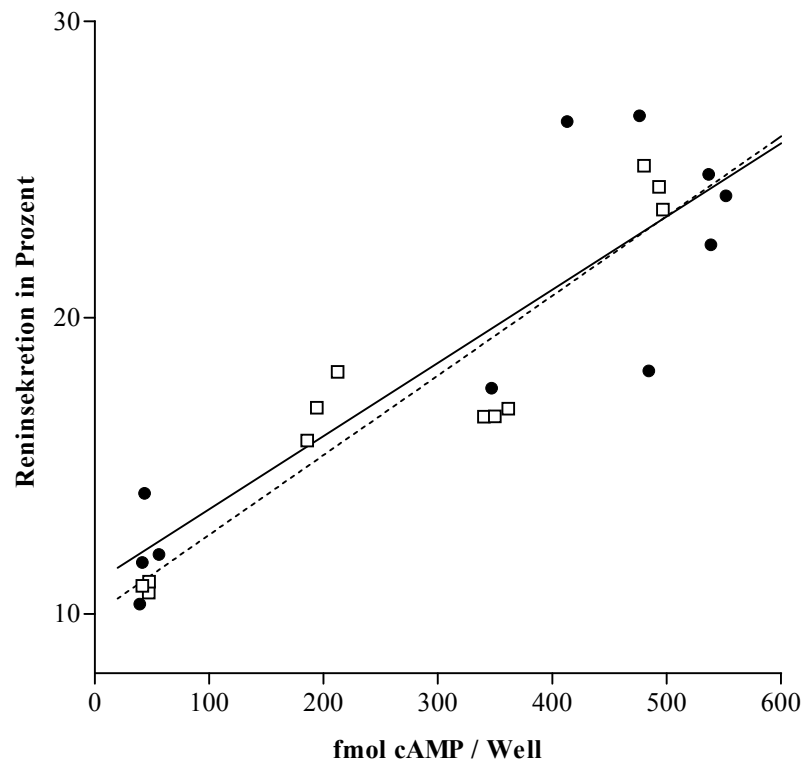


Abb. 3.11 Korrelation von Reninsekretionsrate in Prozent und cAMP-Gehalt in fmol cAMP / Well von isolierten nativen JG-Zellen bei normalem und hohem Kalziumgehalt der JG-Zellen. *durchgezogene Linie* Ausgleichsgerade bei normalem Kalziumgehalt ($R^2 = 0,7899$), *unterbrochene Linie* Ausgleichsgerade bei hohem Kalziumgehalt ($R^2 = 0,8637$), ● normaler Kalziumgehalt, □ hoher Kalziumgehalt.

3.2.7. Supraphysiologische cAMP-Stimulation

Die bisher erhobenen Daten haben deutlich gemacht, dass zwischen der Rate der Reninsekretion und dem cAMP-Gehalt der kultivierten Zellen eine feste Korrelationsbeziehung besteht. Deshalb sollte nun durch Kombination von unspezifischer Aktivierung von Adenylatzyklen und gleichzeitiger unspezifischer Hemmung von Phosphodiesterasen in der Zelle ein supraphysiologischer cAMP-Gehalt erzeugt werden, um zu untersuchen, ob es bestimmte Schwellenwerte für einen Maximaleffekt gibt und wie sich Modulationen oberhalb dieses Wertes auswirken.

Dazu wurden sowohl Forskolin, als auch IBMX in den maximal effektiven Konzentrationen der vorhergehenden Versuche eingesetzt (5 μM bzw. 100 μM). Der Versuchsaufbau mit der Frage eines Kalziumeinfluss auf die Stimulation war analog der bisherigen Experimente. Bei $N = 4$ Versuchen zur Reninsekretionsrate lag die Kontrolle bei $11,15 \pm 1,34 \%$ und die Stimulation mit Forskolin 5 μM und IBMX 100 μM ($25,62 \pm 3,31 \%$) unterschied sich nicht signifikant von der Vergleichsbedingung Forskolin 5 μM ($24,83 \pm 3,65 \%$). Diese Zunahme der Reninausschüttung konnte durch keine der kalziummobilisierenden Substanzen (Thapsigargin 1 μM , $24,23 \pm 2,73 \%$; Angiotensin II 1 μM , $22,68 \pm 3,13 \%$; Endothelin-1 10 nM, $22,79 \pm 2,87 \%$) mehr signifikant beeinflusst werden (Abb. 3.12).

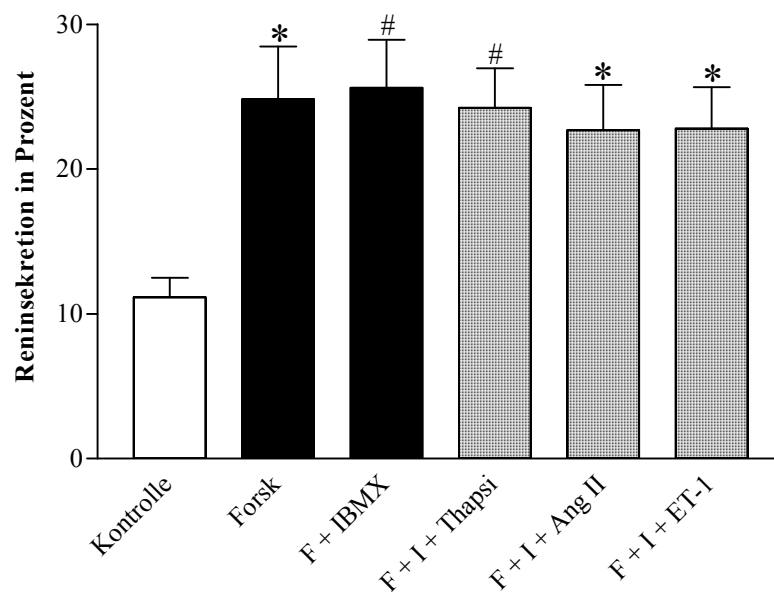


Abb. 3.12 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf die durch Forskolin und IBMX in Kombination stimulierte Reninsekretionsrate in isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* und *F* Forskolin (5 μM), *IBMX* und *I* 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μM), *Thapsi* Thapsigargin (1 μM), *Ang II* Angiotensin II (1 μM), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle, # $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

In den analog durchgeführten Untersuchungen zum cAMP-Gehalt der Zellen kletterte die Stoffmenge cAMP pro Well bei gleichen Versuchsbedingungen im Mittel aus drei Versuchen bei kombinierter Stimulation mit Forskolin 5 μM und IBMX 100 μM ($739,4 \pm 73,0$ fmol / Well) stärker, jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur Stimulation mit Forskolin 5 μM allein ($524,3 \pm 64,9$ fmol / Well; Kontrolle: $41,5 \pm 9,1$ fmol / Well). Diese extreme Zunahme des intrazellulären cAMP-Spiegels konnte durch Thapsigargin

1 μM ($627,3 \pm 65,1$ fmol / Well), Angiotensin II 1 μM ($613,7 \pm 51,7$ fmol / Well) und Endothelin-1 10 nM ($623,2 \pm 67,2$ fmol / Well) nicht mehr unter den Wert der Forskolinstimulation gedrückt werden (Abb. 3.13).

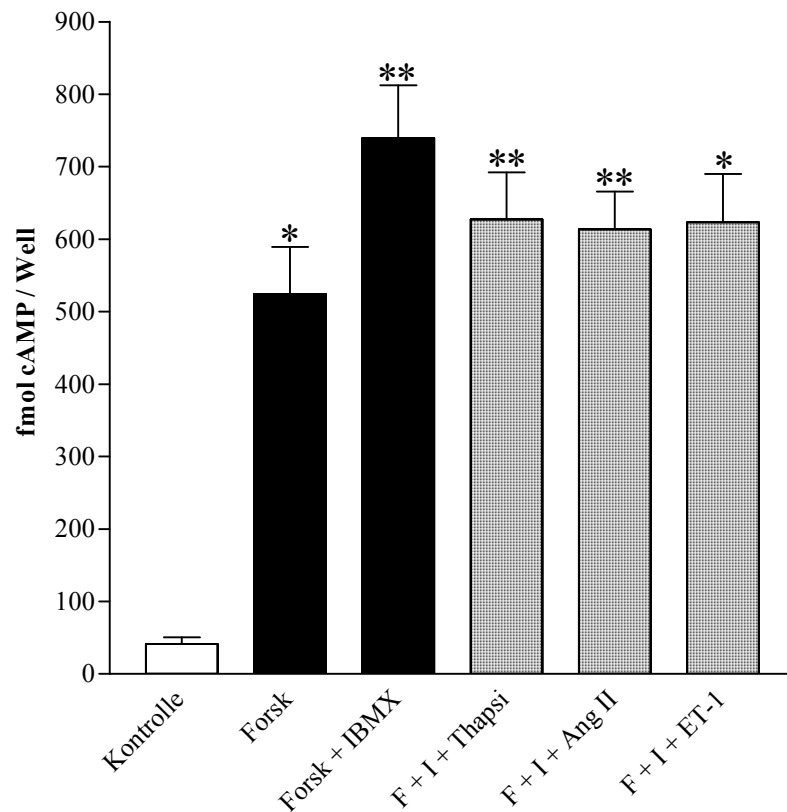


Abb. 3.13 Einfluss von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 auf den durch Forskolin und IBMX in Kombination stimulierten cAMP-Gehalt von isolierten nativen JG-Zellen bei Inkubation für 4h. *Forsk* und *F* Forskolin (5 μM), *IBMX* und *I* 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μM), *Thapsi* Thapsigargin (1 μM), *Ang II* Angiotensin II (1 μM), *ET-1* Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Einzelversuchsmittelwerten; * $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, ** $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass oberhalb einer gewissen intrazellulären Konzentration an cAMP, die etwa bei Stimulation mit Forskolin 5 μM erreicht ist, eine weitere Zunahme des zytoplasmatischen cAMP-Gehaltes keine weitere Steigerung der Reninfreisetzung mehr bewirkt. Eine Modulation der zellulären cAMP-Konzentration durch Kalzium oberhalb dieses Levels der maximalen Reninstimulation wirkt sich nicht auf die Reninsekretion aus.

3.3. Experimente an As4.1-Zellen

Insgesamt betrachtet, deuten die in der primären Zellkultur beobachteten Effekte auf eine wesentliche Rolle kalziumhemmbarer Adenylatzyklasen für die kalziumabhängige Hemmung der Reninsekretion hin. Da aber bei der Isolation von JG-Zellen aus der Gesamtniere eine gewisse Kontamination mit anderen Zelltypen nicht auszuschließen ist, sollten die wesentlichen Versuche an der immortalisierten juxtaglomerulären Zelllinie As4.1 wiederholt werden. Ein weiteres Ziel dieser Experimente war es, ein Zellmodell zu etablieren, in dem durch spezifischen Knockdown die Relevanz bestimmter Adenylatzyklaseisoformen für dieses Phänomen überprüft werden konnte. In diesem Zusammenhang bot sich ein Einsatz der so genannten small interfering RNA (siRNA) –Technik in As4.1-Zellen an. Weil diese Zelllinie im Basalzustand eine hohe Phosphodiesteraseaktivität besitzt (Klar et al., 2002), wurden alle Experimente in Anwesenheit von IBMX 100 μ M durchgeführt. Da die As4.1-Zellen, die in unseren Experimenten zum Einsatz kamen keine Angiotensin II-Rezeptoren exprimieren, wurde für die intrazelluläre Erhöhung des Kalziumgehaltes nur Thapsigargin und Endothelin-1 eingesetzt.

3.3.1. Knockdown von AC5 und AC6 mit siRNA-Technik

Die siRNA-Technik bietet die Möglichkeit, durch gezielte Herunterregulation einzelner Genprodukte, die Bedeutung der entsprechenden ausfallenden Proteine zu analysieren. Aufgrund dieser Eigenschaften sollte mit dieser Methode die funktionelle Relevanz der kalziumregulierten Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 für die Regulation der Reninsekretion in As4.1-Zellen untersucht werden. Dafür musste zunächst die Spezifität der eingesetzten siRNA sichergestellt werden. Spezifische siRNA führt intrazellulär zu einem Abbau der komplementären mRNA, während nicht-komplementäre mRNA nicht beeinflusst wird. Weil sich AC5 und AC6 sowohl in ihren Eigenschaften, als auch in ihren Funktionen sehr ähnlich sind, war es besonders wichtig, die genaue Herunterregulation einer Isoform und die gleichzeitige Integrität der jeweils anderen Isoform sicherzustellen. Aus diesem Grund wurden zunächst die mRNA-Expressionsmuster der As4.1-Zellen nach Inkubation mit AC5 bzw. AC6 spezifischen

siRNA-Gemischen für 72 Stunden analysiert. Um den versuchsbedingt unterschiedlichen mRNA-Extraktionsmengen pro Experiment Rechnung zu tragen, wurde die Menge an Adenylatzyklasen mRNA durch die Menge an β -Aktin mRNA dividiert und dieser Quotient auf das Verhältnis in Kontrollzellen (nur Transfektionsreagenz ohne siRNA) bezogen. AC5 gerichtete siRNA verminderte die mRNA-Expression für AC5 auf etwa ein Drittel der Kontrolle ($32,6 \pm 2,2$ %). Bei AC6 spezifischer siRNA war die Supprimierung der komplementären mRNA sogar noch deutlicher (AC6 siRNA: $26,7 \pm 6,0$ %). Eine noch stärkere Herunterregulation ergab sich für die Kombination von AC5 und AC6 spezifischen siRNAs: AC5 mRNA Level ($17,9 \pm 2,6$ %) und AC6 mRNA Level ($15,7 \pm 3,7$ %) wurden auf weniger als ein Fünftel der Kontrolle herabreguliert. Trotz diesen deutlichen Effekten auf die komplementäre mRNA konnte eine hohe Spezifität der siRNA-Sonden festgestellt werden. AC5 siRNA hatte keinen inhibierenden Einfluss auf die AC6 mRNA-Expression ($112,8 \pm 16,5$ % der Kontrollzellen) und umgekehrt war AC6 siRNA nicht signifikant supprimierend für AC5 mRNA ($82,9 \pm 10,1$ % der Kontrollzellen). Ein Gemisch ungerichteter siRNA-Moleküle ohne Zielgen wirkte sich weder auf die AC5 mRNA-Level ($95,9 \pm 13,6$ %), noch auf die AC6 mRNA-Level ($94,7 \pm 11,1$ %) signifikant aus (Abb. 3.14).

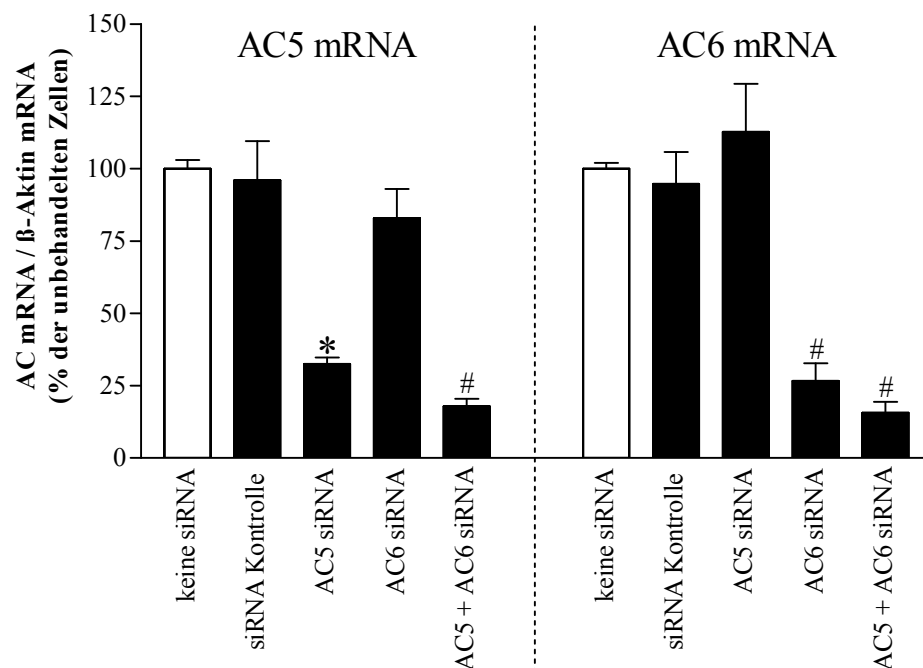


Abb. 3.14 mRNA Expression von AC5 und AC6 bezogen auf die Kontrolle ohne siRNA nach Transfektion mit unspezifischer und mit AC5 bzw. AC6 spezifischer siRNA bei Inkubation für 72 h. AC Adenylatzyklase; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; * $p < 0,05$ gegenüber der siRNA Kontrolle, # $p < 0,01$ gegenüber der siRNA Kontrolle.

Die eben erläuterten Untersuchungen zum mRNA-Gehalt bestätigten also die Spezifität der siRNA Sonden. Um auf zellulärer Ebene aber funktionelle Auswirkungen zu haben, muss sich der siRNA-Knockdown auch auf Proteinebene widerspiegeln. Aus diesem Grund wurde Proteinexpression von AC5 siRNA transfizierten As4.1-Zellen mit der Western-Blot-Technik untersucht. Wie bereits im Methodenteil erwähnt, konnte die Proteinexpression für die Isoform AC6 mangels eines spezifischen und selektiven Antikörpers nicht bestimmt werden.

Die Veränderungen, die auf mRNA-Niveau beobachtet wurden, fanden sich in paralleler Weise auch auf Proteinebene wieder. Bezogen auf das Referenzprotein β -Aktin verringerte die Transfektion mit AC5 spezifischer siRNA ($0,033 \pm 0,013$), ebenso wie die doppelte Transfektion mit AC5 und AC6 siRNA ($0,031 \pm 0,011$) den Gehalt an AC5 Protein auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes ($0,106 \pm 0,021$). Die Transfektion mit AC6 siRNA ($0,108 \pm 0,023$) hatte dabei auf den AC5 Proteinlevel keinen signifikanten Einfluss, was die hohe Spezifität der siRNA Sonden nochmals unterstreicht und wiederum den Vorbefunden der mRNA-Bestimmung entspricht (Abb. 3.15).

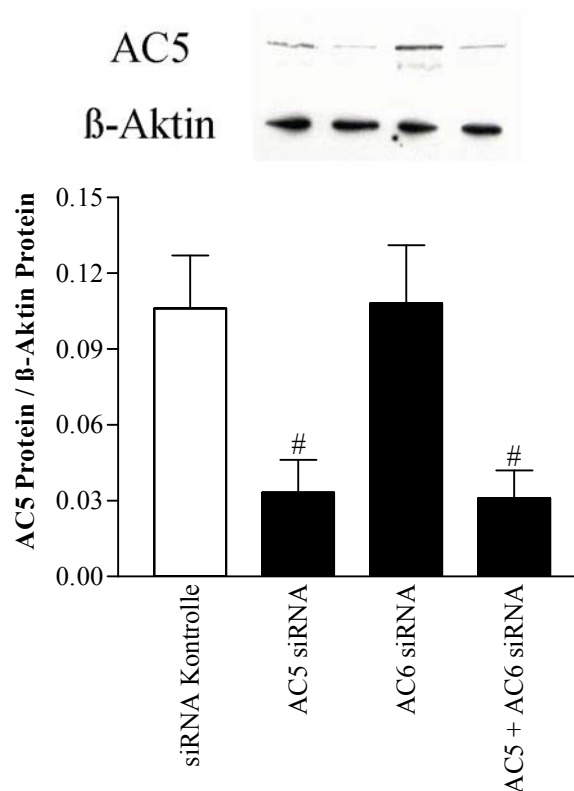


Abb. 3.15 Expression des AC5 Proteins in As4.1-Zellen nach Transfektion mit siRNA Kontrolle und mit für AC5 bzw. AC6 spezifischer siRNA. AC Adenylatzyklase; Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus vier Einzelversuchsmittelwerten; # $p < 0,01$ gegenüber der siRNA Kontrolle.

3.3.2. Funktionelle Relevanz von AC5 und AC6

Nachdem die Spezifität und die Funktionalität der siRNA Sonden durch die Vorversuche sichergestellt waren, konnten jetzt die zentralen Experimente zur Reninsekretion und zum cAMP-Gehalt, namentlich die Stimulationsmanöver mit Forskolin bzw. Isoproterenol, an siRNA transfizierten As4.1-Zellen wiederholt werden.

3.3.2.1. Forskolinstimulation

Zuerst stellte sich die Frage, ob sich die Beobachtungen bei unspezifischer Aktivierung von Adenylatzyklasen mit Forskolin in JG-Zellen analog in den unspezifisch mit Kontroll-siRNA transfizierten As4.1-Zellen widerspiegeln. In N=5 Versuchen hob Forskolin 5 μ M ($55,0 \pm 2,0$ %) die Reninsekretionsrate in diesen Zellen auf etwa den doppelten Wert der Kontrolle ($29,0 \pm 5,0$ %). Thapsigargin 1 μ M ($41,2 \pm 4,1$ %) bzw. Endothelin-1 10 nM ($45,0 \pm 3,0$ %) schwächten diese Stimulation wiederum signifikant um etwa die Hälfte ab (Abb. 3.16). Dieses Ergebnis bestätigte zunächst einmal die Ergebnisse und Erkenntnisse aus den Untersuchungen an JG-Zellen, welche eine bedeutende Rolle der Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 für die kalziumabhängige Hemmung der Reninfreisetzung nahe gelegt hatten. Besonders interessant war an dieser Stelle deswegen das Sekretionsverhalten von spezifisch transfizierten As4.1-Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle, in der Forskolin 5 μ M die Reninausschüttung fast verdoppelte, war die Sekretionssteigerung in Zellen mit reduzierter AC5 Expression (Von $24,4 \pm 2,5$ % auf $41,1 \pm 4,8$ %) und in Zellen mit reduzierter AC6 Expression (Von $27,4 \pm 5,8$ % auf $42,6 \pm 1,0$ %) weniger ausgeprägt, jedoch immer noch signifikant. Deutliche Differenzen zeigten sich jedoch im Einfluss von Kalzium auf die vorstimulierte Sekretionsrate. Im Gegensatz zu den unspezifisch transfizierten Zellen konnte in AC5 siRNA transfizierten Zellen Thapsigargin 1 μ M ($39,9 \pm 7,8$ %) und Endothelin-1 10 nM ($41,1 \pm 6,9$ %) die Reninfreisetzungsrates nicht mehr entscheidend abschwächen. Ein ähnliches Bild stellte sich in AC6 siRNA behandelten Zellen dar: Keiner der Kalziumliberatoren (Thapsigargin 1 μ M: $40,3 \pm 4,3$ %; Endothelin-1 10 nM: $45,2 \pm 2,4$ %) vermochte die Reninsekretion signifikant zu vermindern (Abb. 3.16). Da sowohl die Transfektion mit AC5 siRNA, als auch die mit AC6 siRNA sehr ähnliche Auswirkungen auf die beschriebenen Stimulationsmanöver hatte, wurde das Verhalten der Zellen auch bei kombinierter Transfektion mit AC5 siRNA und AC6 siRNA näher beleuchtet. In doppelt transfizierten Zellen erhöhte

Forskolin 5 μM ($30,0 \pm 2,5 \%$) die Reninausschüttung zunächst nicht mehr signifikant gegenüber der Kontrolle ($26,2 \pm 1,4 \%$) und sowohl Thapsigargin 1 μM ($26,0 \pm 4,6 \%$) als auch Endothelin-1 10 nM ($30,1 \pm 2,8 \%$) zeigten auf die vorstimulierten Werte keinen signifikant hemmenden Einfluss. Bei kombiniertem Knockdown der beiden Adenylatzyklaseisoforamen AC5 und AC6 waren die drei verschiedenen Stimulationsbedingungen also nicht von der Kontrolle zu unterscheiden (Abb. 3.16).

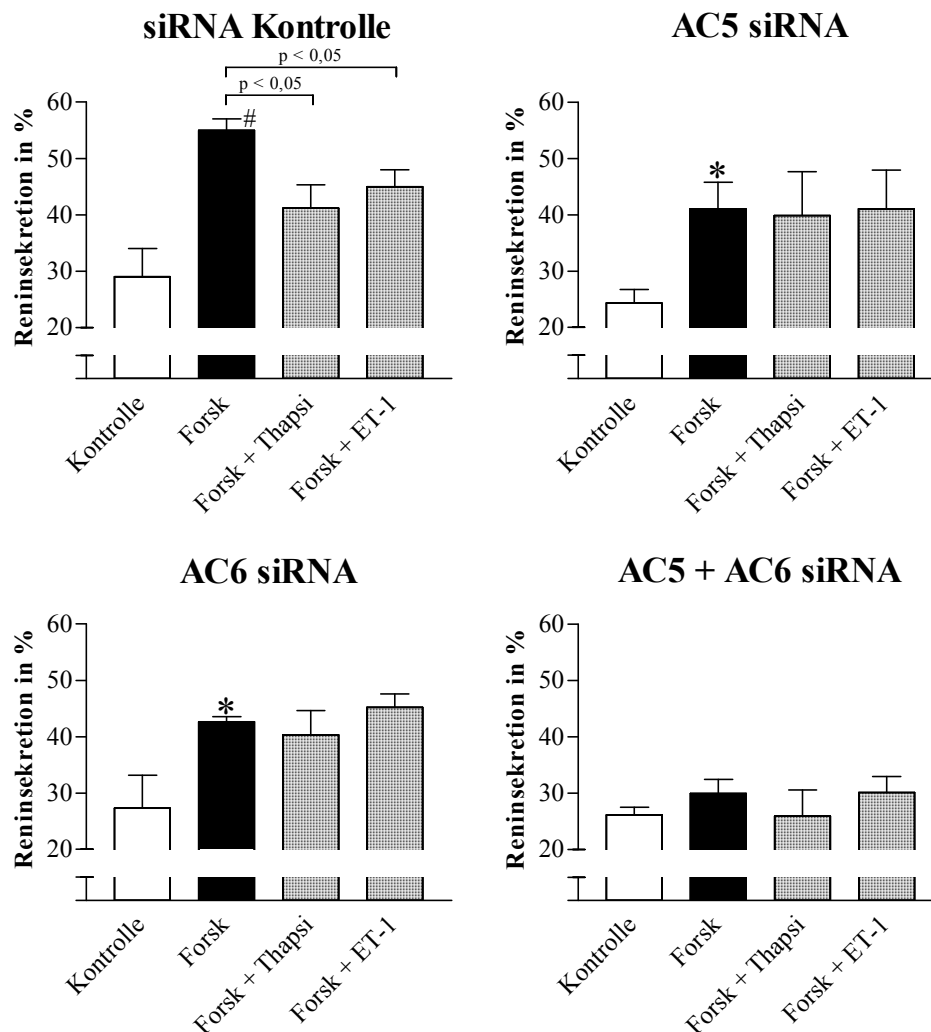


Abb. 3.16 Einfluss von Thapsigargin und Endothelin-1 auf die durch Forskolin stimulierte Reninsekretionsrate von 72 h vor Stimulation transfizierten As4.1-Zellen bei Inkubation für 4h. Kontrolle 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μM), Forsk und F Forskolin (5 μM), Thapsi Thapsigargin (1 μM), ET-1 Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf Einzelversuchsmittelwerten; # $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle, * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Zusammenfassend untermauerten die Resultate der eben beschriebenen Reninsekretionsversuche eine wesentliche Rolle von AC5 und AC6 für die

kalziumabhängige Inhibition der Reninsekretion. Da aus den bisherigen Versuchen die enge Verknüpfung von Reninfreisetzung und cAMP-Gehalt bekannt war, wurden Untersuchungen dazu angeschlossen. Zunächst einmal zeigte sich, dass trotz der verminderten Expression von AC5 und AC6 der basale intrazelluläre cAMP-Gehalt durch die Transfektion nicht signifikant gemindert wurde. In Kontroll-siRNA transfizierten Zellen konnte durch Forskolin 5 μM (848 ± 90 fmol / Well) eine klare Steigerung der Stoffmenge cAMP pro Well bezogen auf die Kontrolle (145 ± 11 fmol / Well) erreicht werden. Ganz entsprechend den Vorbefunden aus nativen JG-Zellen und analog zur Veränderung der Reninsekretion in As4.1-Zellen verminderten die Kalziumliberatoren Thapsigargin 1 μM (412 ± 85 fmol / Well) und Endothelin-1 10 nM (435 ± 93 fmol / Well) in den Zellen der Transfektionskontrolle den cAMP-Gehalt auf etwa auf die Hälfte (Abb. 3.17). In spezifisch transfizierten As4.1-Zellen war zunächst einmal die Stimulationswirkung von Forskolin 5 μM augenscheinlich niedriger: Verglichen mit unspezifisch transfizierten Zellen reduzierte sich sowohl in Zellen mit niedriger AC5 Expression (379 ± 41 fmol / Well; Kontrolle 156 ± 15 fmol / Well), wie auch in Zellen mit herabgesetzter AC6 Expression (340 ± 31 fmol / Well; Kontrolle: 145 ± 8 fmol / Well) die Steigerung des cAMP-Spiegels durch Forskolin 5 μM auf etwa die Hälfte. Diese Zunahme war jedoch immer noch signifikant. Demgegenüber verhinderte eine abgesenkte Expression von AC5 aber die in JG-Zellen und unspezifisch transfizierten As4.1-Zellen beobachtete, hemmende Wirkung von Thapsigargin 1 μM (309 ± 46 fmol / Well) und Endothelin-1 10 nM (322 ± 29 fmol / Well) auf den vorstimulierten cAMP-Gehalt. Derselbe Effekt konnte in AC6 siRNA transfizierten Zellen festgestellt werden: Sowohl Thapsigargin 1 μM (279 ± 46 fmol / Well) als auch Endothelin-1 10 nM (286 ± 10 fmol / Well) hatten keinen signifikant inhibierenden Einfluss mehr (Abb. 3.17). Entsprechend der Experimente zur Reninfreisetzung in As4.1-Zellen wurde der cAMP-Gehalt für doppelt transfizierte Zellen ebenfalls bestimmt. Zum einen wich in Zellen mit kombiniert niedrigen Leveln an AC5 und AC6 - analog den Ergebnissen der Reninmessung - die Stimulation durch Forskolin 5 μM (265 ± 38 fmol / Well) nicht mehr signifikant von der Kontrolle (192 ± 23 fmol / Well) ab. Zum anderen hatte unter diesen Versuchsbedingungen weder Thapsigargin 1 μM (259 ± 36 fmol / Well) noch Endothelin-1 10 nM (266 ± 34 fmol / Well) einen inhibierenden Einfluss auf die vorstimulierten cAMP-Werte, so dass diese Werte ebenso nicht unterschiedlich zur Kontrolle waren (Abb. 3.17).

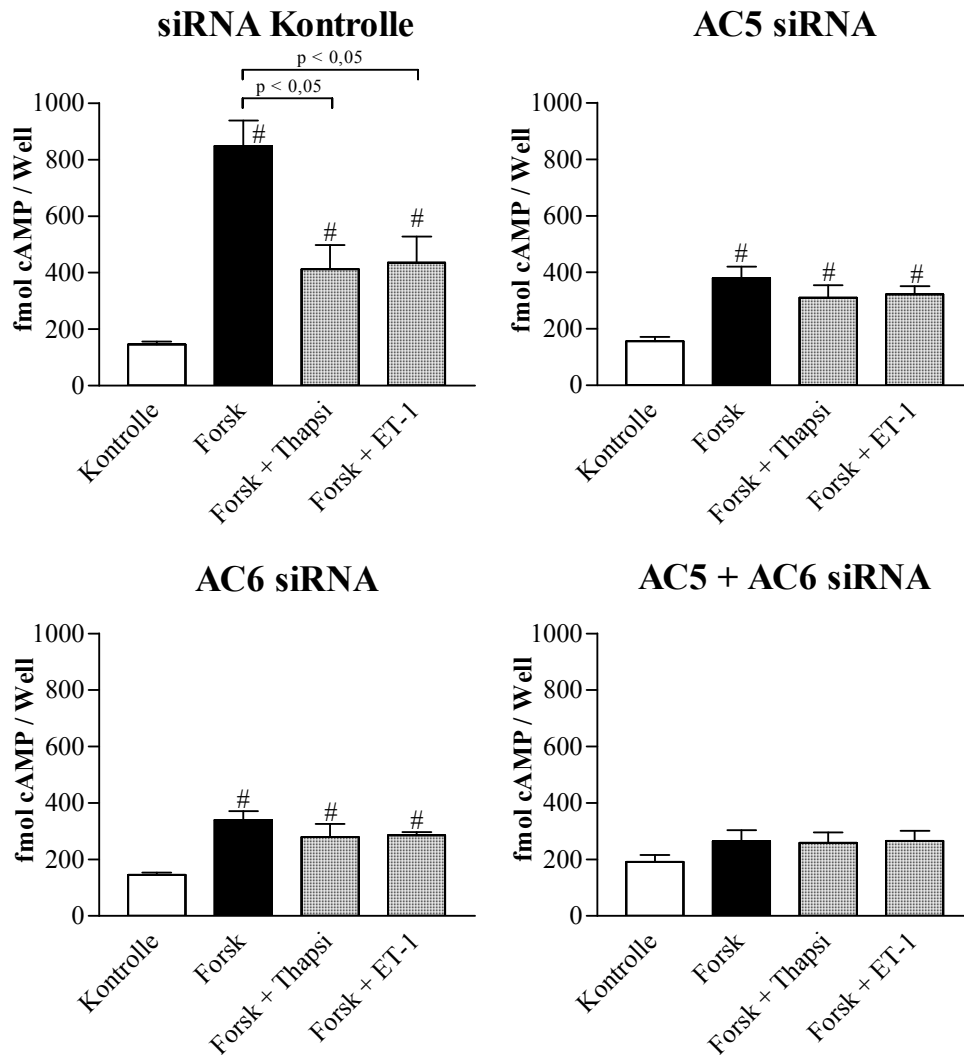


Abb. 3.17 Einfluss von Thapsigargin und Endothelin-1 auf den durch Forskolin stimulierten cAMP-Gehalt von 72 h vor Stimulation transfizierten As4.1-Zellen bei Inkubation für 4h. Kontrolle 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μ M), Forsk und F Forskolin (5 μ M), Thapsi Thapsigargin (1 μ M), ET-1 Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf Einzelversuchsmittelwerten; # p < 0,01 gegenüber der Kontrolle.

Insgesamt lässt sich also konstatieren, dass sowohl der Knockdown von AC5, als auch der Knockdown von AC6 den Effekt von Kalzium auf die Forskolin stimulierte Reninsekretion potent reduzieren. Auf die basale Sekretionsrate hat eine reduzierte Expression von AC5 oder AC6 keinen Einfluss, was sich auch in den Messungen des cAMP-Gehaltes widerspiegelt. Ein Knockdown beider kalziumhemmbarer Adenylatzyklen verhindert eine Steigerung der Reninausschüttung aus As4.1-Zellen komplett, was ebenfalls mit entsprechend niedrigeren cAMP-Spiegeln der Zellen einhergeht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe machen erneut eine funktionelle

Bedeutung der Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 für die kalziumabhängige Hemmung der Reninsekretion deutlich.

3.3.2.2. Isoproterenolstimulation

Um die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Experiment zu untermauern, wurde - entsprechend den Experimenten an isolierten JG-Zellen - auch die rezeptorvermittelte Aktivierung der Reninsekretion mit Isoproterenol im As4.1-Zellmodell überprüft.

Bei den Versuchen zur Reninausschüttung ergaben sich folgende Beobachtungen: In den unspezifisch transfizierten Zellen hob Isoproterenol 100 nM ($33,7 \pm 2,0$ %) die Reninsekretionsrate im Vergleich zur Kontrolle ($25,3 \pm 1,6$ %) etwas weniger als Forskolin 5 μ M an. Dieses Stimulationsverhalten wurde so auch in nativen JG-Zellen beobachtet. In Zellen mit reduzierter AC5 Expression (Von $25,6 \pm 1,7$ % auf $30,8 \pm 0,6$ %) und in Zellen mit reduzierter AC6 Expression (Von $25,9 \pm 1,6$ % auf $30,1 \pm 0,7$ %) war dieser Effekt von Isoproterenol 100 nM weniger ausgeprägt. Allerdings war er immer noch signifikant unterschiedlich zur Kontrollbedingung, wohingegen in AC5 und AC6 siRNA doppelt transfizierten Zellen keine signifikante Steigerung der Reninsekretionsrate (von $26,4 \pm 0,9$ % auf $27,4 \pm 1,0$ %) mehr nachgewiesen werden konnte. Der Einfluss der Kalziumliberatoren auf diese vorstimulierten Werte zeigte sich wie folgt: In den Zellen der Transfektionskontrolle minderte sowohl Thapsigargin 1 μ M ($28,5 \pm 1,3$ %) als auch Endothelin-1 10 nM ($28,6 \pm 1,7$ %) die Reninausschüttung signifikant, was den Beobachtungen in JG-Zellen entspricht. Demgegenüber hatte der Zusatz dieser Substanzen in spezifisch transfizierten As4.1-Zellen keinen inhibierenden Effekt mehr: In AC5 siRNA transfizierten Zellen konnte weder Thapsigargin 1 μ M ($30,0 \pm 1,2$ %) noch Endothelin-1 10 nM ($30,6 \pm 1,1$ %) die mit Isoproterenol vorstimulierte Reninfreisetzungsrates vermindern. Gleiches galt für AC6 siRNA transfizierte Zellen, in denen die Reninsekretionsraten ähnliche Werte aufwiesen (Thapsigargin 1 μ M: $30,0 \pm 0,8$ %; Endothelin-1 10 nM: $30,2 \pm 1,3$ %). In den doppelt transfizierten Zellen mit reduzierter Expression von AC5 und AC6 zeigte sich bei Applikation von Thapsigargin 1 μ M ($26,9 \pm 0,7$ %) oder Endothelin-1 10 nM ($27,3 \pm 1,7$) ebenfalls kein hemmender Einfluss auf die Sekretionsrate mehr, so dass in diesen Zellen keine der Stimulationsbedingungen signifikant unterschiedlich zur Kontrolle war (Abb. 3.18).

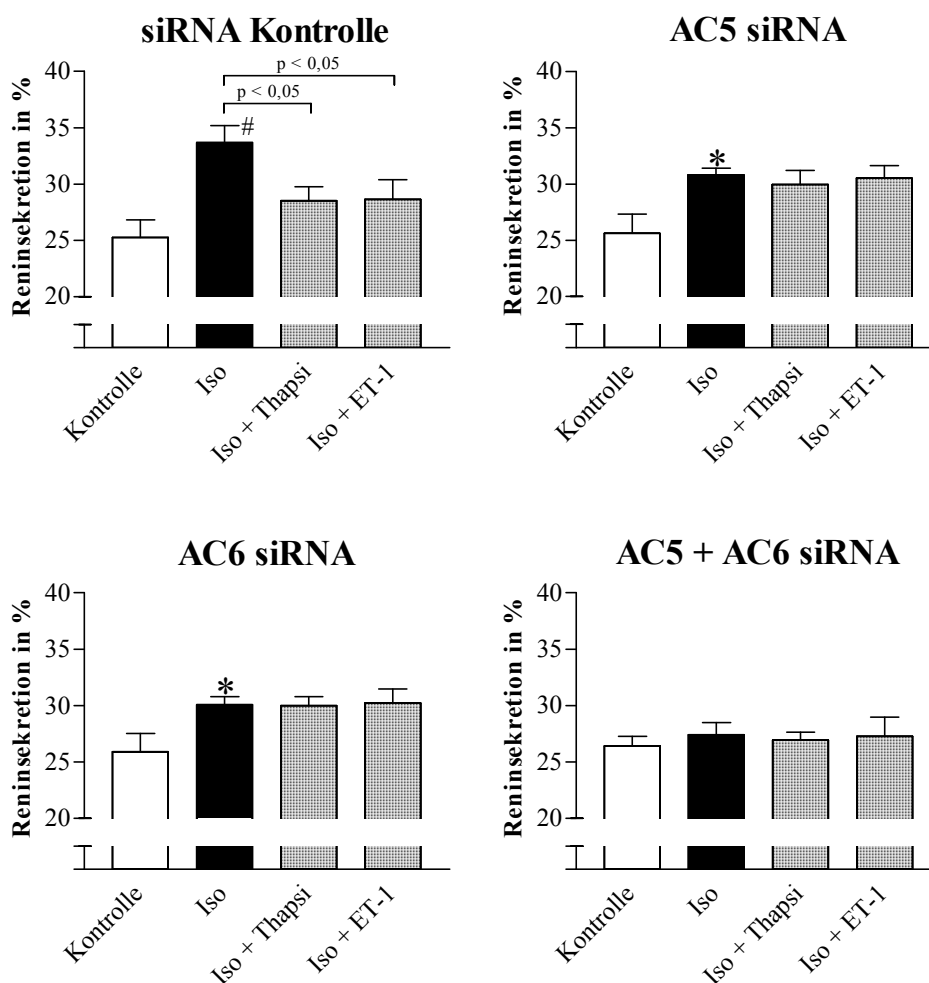


Abb. 3.18 Einfluss von Thapsigargin und Endothelin-1 auf die durch Isoproterenol stimulierte Reninsekretionsrate von 72 h vor Stimulation transfizierten As4.1-Zellen bei Inkubation für 4h. Kontrolle 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μ M), Iso Isoproterenol (100 nM), Thapsi Thapsigargin (1 μ M), ET-1 Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf Einzelversuchsmittelwerten; # p < 0,01 gegenüber der Kontrolle, * p < 0,05 gegenüber der Kontrolle.

Zur Abrundung und Vervollständigung der Resultate schlossen sich auch hier Untersuchungen zum cAMP-Gehalt bei Isoproterenolstimulation an. Vorab ist zu diesen Experimenten anzumerken, dass die Messwerte für die Kontrollbedingung jeweils mit den unter Punkt 3.3.2.1. beschriebenen Versuchen (Forskolinstimulation) identisch sind, da sie in einer gemeinsamen Versuchsreihe durchgeführt wurden.

Analog zu den Ergebnissen in JG-Zellen hob Isoproterenol 100 nM (672 ± 34 fmol / Well) den intrazellulären cAMP-Gehalt in unspezifisch transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle (145 ± 11 fmol / Well) deutlich, wenn auch weniger als Forskolin 5 μ M (848 ± 90 fmol / Well). Diese Steigerung wurde durch Thapsigargin 1 μ M (213 ± 48 fmol / Well) und Endothelin-1 10nM (222 ± 31 fmol / Well) auf etwa ein Drittel reduziert (Abb3.19). In den spezifisch transfizierten Zellen zeigten die

Stimulationsmanöver folgende Auswirkungen auf die cAMP-Spiegel. In Zellen mit reduzierter Expression der Adenylatzyklaseisoform AC5 hob Isoproterenol 100 nM den cAMP-Gehalt nur noch etwa um den Faktor Zwei (von 156 ± 15 fmol / Well auf 349 ± 15 fmol / Well) an. Ähnliches galt für AC6 siRNA transfizierte Zellen, in denen der cAMP-Spiegels ebenfalls nur um das Doppelte (von 145 ± 8 fmol / Well auf 299 ± 22 fmol / Well) stieg. Erwartungsgemäß war die Hemmwirkung der Kalziumliberatoren in den spezifisch transfizierten Zellen aufgehoben: Sowohl Thapsigargin $1\mu\text{M}$ (AC5 siRNA: 312 ± 20 fmol / Well; AC6 siRNA: 262 ± 35 fmol / Well) als auch Endothelin-1 10 nM (AC5 siRNA: 327 ± 17 fmol / Well; AC6 siRNA: 271 ± 37 fmol / Well) konnten bei reduzierter Expression von AC5 oder AC6 ihre inhibierende Wirkung auf den cAMP-Gehalt nicht ausüben (Abb. 3.19). Der Knockdown einer einzigen der beiden Adenylatzyklaseisoformen AC5 oder AC6 verhinderte also potent die Absenkung des mit Isoproterenol 100 nM vorstimulierten cAMP-Niveaus durch Kalziumliberatoren. Diese Beobachtung entsprach den Befunden aus der Versuchsreihe mit Forskolinstimulation (Punkt 3.3.2.1.). Um die Versuchsreihe zu komplettieren, wurden die intrazellulären cAMP-Spiegel schließlich auch für doppelt transfizierte Zellen analysiert. Wie nach den Vorbefunden anzunehmen war, konnte die spezifische β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol 100 nM in AC5 und AC6 siRNA zweifach transfizierten Zellen den cAMP-Spiegel (269 ± 49 fmol / Well) nicht mehr signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (192 ± 23 fmol / Well) anheben. Weiterhin hatten Thapsigargin $1\mu\text{M}$ (252 ± 25 fmol / Well) und Endothelin-1 10 nM (274 ± 41 fmol / Well) auf diesen Wert keinen inhibierenden Einfluss mehr. Bei kombiniertem Knockdown von AC5 und AC6 waren also sowohl die beobachteten fördernden als auch die hemmenden Einflüsse der aktiven Substanzen aufgehoben und die Messwerte für den intrazellulären cAMP-Level nicht von der Kontrollbedingung zu unterscheiden (Abb. 3.19).

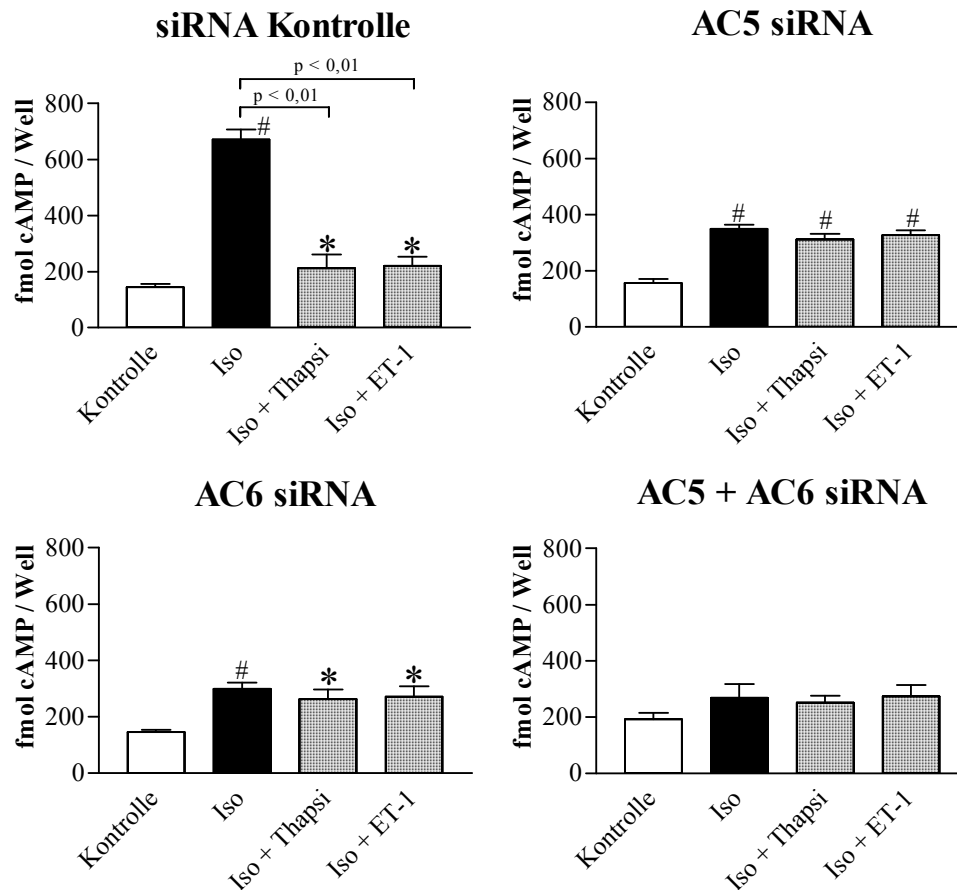


Abb. 3.19 Einfluss von Thapsigargin und Endothelin-1 auf den durch Isoproterenol stimulierten cAMP-Gehalt von 72 h vor Stimulation transfizierten As4.1-Zellen bei Inkubation für 4h. Kontrolle 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (100 μ M), Iso Isoproterenol (100 nM), Thapsi Thapsigargin (1 μ M), ET-1 Endothelin-1 (10 nM); Die dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus fünf Einzelversuchsmittelwerten; # $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle; * $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

In der Gesamtschau ist damit festzuhalten, dass die Ergebnisse bei β -adrenerger Aktivierung von Adenylatzyklen durch Isoproterenol die Aussagen der vorangegangenen Versuchsreihe mit direkter AC-Aktivierung bestätigen. Darüber hinaus unterstreichen die Resultate noch einmal die funktionell bedeutsame Rolle von AC5 und auch AC6 für die kalziumvermittelte Hemmung der Reninsekretion.

4. Diskussion

Im Gegensatz zu anderen sekretorisch aktiven Zellen, in denen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration den Exozytosevorgang initiiert, unterstützt oder aufrechterhält, hemmt diese in JG-Zellen die Reninfreisetzung. Dieses Phänomen ist unter dem Begriff „Kalzium-Paradoxon“ der Reninsekretion in die Nierenphysiologie eingegangen (Hackenthal et al., 1990; Hackenthal und Taugner, 1986; Taugner et al., 1988). In vielen vorangegangenen Studien wurde für verschiedene Hormone oder andere Botenstoffe, die die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigern, dieses Phänomen gezeigt. Auch für den Feedbackregulator des RAAS Angiotensin II wurde eine kalziumabhängige Unterdrückung der Reninsekretion infolge einer Angiotensin-Rezeptor-Aktivierung in mehreren Untersuchungen berichtet (Hackenthal et al., 1990; Schweda und Kurtz, 2004). Ähnliche Effekte wurden für Endothelin, einem anderen natürlichen Regulator des Reninsystems, und Thapsigargin, einem Aktivator von so genannten calcium release activated calcium channels (Schweda et al., 2000; Klar et al., 2005) gefunden. Die zellulären Mechanismen, die dieser kalziumabhängigen Hemmung der Reninsekretion zugrunde liegen, sind bisher nicht zufrieden stellend geklärt worden. Das Ziel dieser Arbeit war deswegen, zu untersuchen, ob die Wirkung von Kalzium auf die Reninsekretion über eine Unterdrückung der cAMP-Signalkaskade - dem Hauptstimulationsweg des Reninsystems - vermittelt wird. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen auf der Rolle der kalziuminhibierbaren Adenylatzyklaseisofomren AC5 und AC6 in diesem Prozess.

Zunächst zeigen die in dieser Studie erhobenen Daten eindeutig, dass ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration sowohl in JG-Zellen, als auch in As4.1-Zellen zu einer deutlichen Reduktion des vorstimulierten intrazellulären cAMP-Gehaltes führt. Da der cAMP-Gehalt einer Zelle aber wiederum durch die Rate des Auf- und Abbaus von cAMP und deren Verhältnis zueinander bestimmt wird und weil JG-Zellen die kalziumaktivierbare Phosphodiesterase 1 (PDE-1) exprimieren (Kurtz et al., 1998b; Klar et al., 2002), ist es denkbar, dass die Abnahme der intrazellulären cAMP-Level durch eine verstärkte Hydrolyse von cAMP bedingt ist. Dagegen spricht allerdings klar, dass die unselektive pharmakologische Blockade von Phosphodiesterasen durch IBMX, welche sowohl die Reninsekretion, als auch den cAMP-Gehalt der Zellen erhöhte, die suppressiven Effekte keines der Kalziumliberatoren auf Reninfreisetzung und cAMP-Gehalt verhindern konnte. Weil IBMX die verschiedenen Phosphodiesterasenisoformen

potent blockiert, ist eine kalziumabhängige Aktivierung nicht mehr anzunehmen, so dass Kalzium entweder auf Adenylatzyklasen oder cAMP direkt Einfluss nehmen muss. Diese These wird auch durch folgende Beobachtung gestützt: Die mittels Applikation von cAMP/AM - ein von Phosphodiesterasen hydrolysierbares cAMP Derivat (Schultz et al., 1994) - gesteigerten cAMP-Spiegel werden durch einen erhöhten intrazellulären Kalziumgehalt nicht signifikant vermindert. Genau das wäre aber bei einer durch Kalziumeinfluss gesteigerten PDE-Aktivität zu erwarten gewesen. Man kann daher mit Recht vermuten, dass die Wirkung von Kalzium auf die Reninsekretionsrate durch Adenylatzyklasen vermittelt wird. Dabei rücken natürlich insbesondere die kalziumhemmbaren Isoformen AC5 und AC6, die sowohl in JG-Zellen wie auch in As4.1-Zellen exprimiert werden, ins Blickfeld.

Beide Isoformen wurden mittels RT-PCR schon in Nierenglomeruli von Ratten (Bek et al., 2001; Charbades et al., 1996) und die Isoform AC6 durch In Situ-Hybridisierung schon in reninproduzierenden Zellen der menschlichen Niere (Wang und Brown, 2004) nachgewiesen. Diese Ergebnisse gehen konform mit den Ergebnissen aus Voruntersuchungen zu dieser Arbeit, bei der die mRNA Expression von AC5 und AC6 sowohl in isolierten JG-Zellen als auch in As4.1-Zellen gezeigt werden konnte. Da keine spezifischen pharmakologischen Inhibitoren dieser Isoformen existieren, wurde die siRNA Technik zum spezifischen Knockdown von AC5, AC6 oder beiden Adenylatzyklasen eingesetzt. Bei Transfektion für 72 Stunden konnte in As4.1-Zellen eine deutliche Reduktion der mRNA Expression der entsprechenden Isoform erreicht werden. Für die Isoform AC5 gelang es darüber hinaus mit der Western-Blot-Technik eine ebenso starke Verminderung auf Proteinebene nachzuweisen. Zwar konnte dies mangels eines geeigneten Antikörpers für die Isoform AC6 nicht direkt gezeigt werden, bei einer Halbwertszeit des AC6-Proteins von etwa 2-3 Tagen (Gao et al., 2002) und in Zusammenschau der übrigen Resultate dieser Versuchsreihe kann jedoch ein Effekt auf die Proteinausstattung der transfizierten Zelle postuliert werden. In der Tat schwächt ein spezifischer Knockdown von AC5 wie auch von AC6 die Stimulation der cAMP-Bildung durch Forskolin oder Isoproterenol merklich ab und verhindert die kalziumvermittelte Hemmung der cAMP-Bildung durch Thapsigargin oder Endothelin-1. Diese Resultate unterstreichen die funktionell wichtige Rolle der beiden Isoformen für die kalziumabhängige Inhibition der cAMP-vermittelt gesteigerten Reninfreisetzungsrates. Die schwache Reststimulation von cAMP durch Forskolin oder Isoproterenol kann zum einen durch Restexpressionen der AC5 und AC6 Proteine,

welche durch die siRNA-Technik nicht komplett herunterreguliert wurden, und zum anderen durch die Aktivität anderer, in As4.1-Zellen exprimierter Adenylatzyklaseisoformen, erklärt werden. Wie in Vorversuchen zu dieser Arbeit festgestellt wurde, exprimieren As4.1-Zellen, ähnlich den JG-Zellen nicht nur die Isoformen AC5 und AC6. Solche Isoformen werden durch Forskolin vermutlich stimuliert, was unabhängig vom Knockdown der AC5 und der AC6 zu erhöhten cAMP-Leveln führt. Interessanterweise führt der Knockdown einer Isoform schon zum Verlust der kalziumabhängigen Unterdrückung des cAMP-Aufbaus, weshalb man eine enge Beziehung beider Isoformen zueinander und Abhängigkeit voneinander annehmen kann. Dies könnte möglicherweise auf einer funktionellen Kopplung beider Isoformen beruhen.

Abgesehen von den eben diskutierten klaren Hinweisen, dass kalziumabhängige Inhibitoren der Reninsekretion die cAMP-Bildung in reninproduzierenden Zellen supprimieren, liefert diese Arbeit drei Nachweise, dass dieser Prozess eine wesentliche Rolle für die Hemmung der Reninausschüttung spielt. Erstens wurde die unter Klemmbedingungen durch cAMP/AM stimulierte Reninsekretionsrate weder durch Thapsigargin, noch durch Angiotensin II, noch durch Endothelin-1 in JG-Zellen gehemmt. Zweites zeigte sich in isolierten JG-Zellen, dass sich die festgestellte Korrelationsbeziehung von cAMP-Gehalt und Reninfreisetzung unter dem Einfluss der Kalziumliberatoren nicht veränderte. Genau dies wäre aber anzunehmen gewesen, hätte Kalzium neben der durch die Unterdrückung der cAMP-Bildung bewirkten Sekretionshemmung noch weitere Effekte auf die Reninfreisetzung. Drittens unterband der spezifische Knockdown von AC5 oder AC6 in As4.1-Zellen komplett die Hemmung der Reninsekretionsrate durch kalziumabhängige Inhibitoren der Reninfreisetzung, was eindeutig auf eine zentrale Rolle von kalziuminhibierbaren Adenylatzyklaseisoformen in der Regulation der Reninausschüttung hinweist.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit untersuchten JG-Zellen, in denen Angiotensin II die cAMP-Bildung supprimiert, stimuliert Angiotensin II die cAMP-Entstehung in kardialen Fibroblasten und Gefäßmuskelzellen der renalen Widerstandsgefäße und der Aorta (Zhang et al., 1997; Mokkapatti et al., 1998; Ostrom et al., 2003). Diese Reaktion auf Angiotensin II kann anhand der unterschiedlichen Expressionsschemata für Adenylatzyklaseisoformen erklärt werden. Während die kalziumaktivierten Isoformen AC3 und AC8 in JG-Zellen nicht exprimiert werden, konnten genau diese in glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta nachgewiesen werden. Die Expression von verschiedenen

Adenylatzyklasen in einem Zelltyp ist nicht ungewöhnlich (Ostrom et al., 2002; Ostrom et al., 2001), wirft aber die Frage auf, wie die unterschiedlich regulierten Adenylatzyklaseisoformen innerhalb einer Zelle selektiv aktiviert werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern auch für diese Frage ein Erklärungsmodell: Die cAMP-Signalkaskade läuft innerhalb der Zelle in hoch geordneten, abgegrenzten Mikrodomänen der Zellmembran ab. So sind konnten beispielsweise in kardialen Fibroblasten die Isoformen AC3, AC5 sowie AC6 in Calveolin-reichen Membranbereichen lokalisiert werden, wohingegen AC2, AC4 und AC7 dort nicht vorgefunden wurden (Ostrom et al., 2003). Dies spricht für eine hoch organisierte Verteilung unterschiedlicher Isoformen innerhalb der Membran. Weiterhin ist zum Beispiel in Kardiomyozyten die Isoform AC6 mit dem β_1 -Adrenozeptor in Calveolin-reichen Membranabschnitten kolokalisiert. Demgegenüber sind Prostaglandin E₂ Rezeptoren nicht in diesen Abschnitten ansässig, was folglich zu einer fehlenden Kopplung von Prostaglandin E₂ Rezeptoren und AC6 abhängiger cAMP-Bildung führt (Ostrom et al., 2001). Eine enge räumliche und funktionelle Kopplung von β -adrenergen Rezeptoren mit AC5 und AC6 könnte somit erklären, warum ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in JG-Zellen die cAMP-Stimulation bei spezifischer Aktivierung von β -adrenergen Rezeptoren durch Isoproterenol vollständig hemmt. Basierend auf dieser engen funktionellen Kopplung würde Isoproterenol in JG-Zellen vor allem AC5 und AC6 aktivieren und diese Stimulation würde wiederum durch Kalzium blockiert werden. Da aber nur die Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 kalziumhemmbar sind, würde andererseits eine unspezifische Aktivierung anderer - kalziumunabhängiger - Isoformen die unvollständige Hemmung Forskolin-stimulierter cAMP-Bildung in JG-Zellen erklären.

Die exakten molekularen Mechanismen über die Kalzium die Aktivität von Adenylatzyklasen hemmt, waren bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen. Während supraphysiologische Kalziumkonzentrationen alle Adenylatzyklaseisoformen inhibieren, werden nur AC5 und AC6 durch physiologische Konzentrationen gehemmt (Defer et al., 2000). Diese Inhibition ist wohl durch eine direkte Bindung von Kalzium an das Enzym bedingt (Scholich et al., 1997; Yoshimura und Cooper, 1992; Boyajian et al., 1991), was erklärt, dass die kalziumabhängige Hemmung der Reninsekretion sowohl bei G-Protein abhängiger, als auch bei G-Protein unabhängiger Stimulation stattfindet und nicht auf einen einzelnen Aktivierungsweg beschränkt ist.

Ergänzend konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass bei Erhöhung der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration auf supraphysiologische Werte ab einer bestimmten Schwelle eine weitere cAMP-Erhöhung nicht mehr zu einer gesteigerten Reninfreisetzung führt. Es ist anzunehmen, dass die Kinetik der cAMP-Signalkaskade bei dieser Schwellenkonzentration ihr Maximum erreicht hat und eine weitere Zunahme der cAMP-Konzentration keine zusätzliche Sekretionssteigerung des Renins mehr bedingt. Eine intrazelluläre Kalziummobilisierung durch die Applikation von Thapsigargin, Angiotensin II und Endothelin-1 erniedrigt das cAMP-Niveau der Zelle nicht mehr unter diesen Schwellenwert und wirkt sich deshalb nicht auf die Rate der Reninfreisetzung aus. Abschließend unterstreicht auch dieser Befund nochmals die direkte Verknüpfung von cAMP-Gehalt, Kalziumkonzentration und Reninausschüttung in murinen JG-Zellen.

5. Zusammenfassung

Aus vielen Untersuchungen ist bekannt, dass einerseits Kalzium einen paradox hemmenden Einfluss auf die Reninfreisetzung ausübt und andererseits cAMP den Hauptstimulationsweg der Reninausschüttung darstellt. Kalziumregulierte Adenylatzyklen könnten deshalb eine Verbindung zwischen diesen beiden Phänomenen bilden und so war Ziel dieser Arbeit die Rolle kalziumhemmbarer Adenylatzyklen auf die Reninsekretionsrate zu untersuchen.

Unter dem Einfluss von kalziumabhängigen Inhibitoren der Reninsekretion (Thapsigargin, Angiotensin II, Endothelin-1) verminderte sich in kultivierten isolierten JG-Zellen die mit Forskolin, IBMX oder Isoproterenol vorstimulierte Reninfreisetzung bzw. cAMP-Bildung jeweils nicht nur gleichsinnig, sondern auch um den gleichen Grad. Im Gegensatz dazu konnte bei Applikation eines membrangängigen cAMP-Analogons (cAMP/AM) unter Klemmbedingungen die Reninausschüttung durch zytoplasmatische Kalziumfreisetzung nicht mehr gehemmt werden. Die beobachtete Korrelation von cAMP-Gehalt und Reninsekretion war dabei vom Kalziumgehalt der Zelle unabhängig. All diese Ergebnisse lassen demnach vermuten, dass Kalzium seine Wirkung auf die Reninfreisetzung vornehmlich über eine Hemmung von Adenylatzyklen vermittelt.

Die Beobachtungen in nativen JG-Zellen konnten in der reninproduzierenden Zelllinie As4.1 bestätigt werden. Darüber hinaus hob in diesen Zellen ein Knockdown der kalziuminhibierbaren Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 die zuvor beschriebenen Kalziumeinflüsse komplett auf, was die funktionelle Relevanz dieser Isoformen in reninproduzierenden Zellen unterstreicht.

In Anbetracht der vollständigen Unterdrückung der Isoproterenolstimulation der Reninsekretion durch Kalziummobilisierung liegt darüber hinaus eine funktionelle Kopplung und räumliche Nähe von kalziumhemmbaren Adenylatzyklaseisoformen und β -adrenergen Rezeptoren in definierten Membranabschnitten von JG-Zellen nahe.

Weiterhin findet die kalziumabhängige Hemmung der Reninfreisetzung sowohl bei G-Protein abhängiger, als auch bei G-Protein unabhängiger Stimulation statt, was verdeutlicht, dass Kalzium seine Wirkung wohl direkt am AC5 bzw. AC6 Enzym ausübt und der Mechanismus der cAMP-Generierung keine Rolle spielt.

Schließlich untermauert die Tatsache, dass die beschriebenen Kalziumwirkungen in primären JG-Zellen auch durch die Applikation des natürlichen Feedbackregulators des

Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems, nämlich Angiotensin II, ausgelöst werden, die physiologische Bedeutung dieses Mechanismus.

Insgesamt demonstrieren die in dieser Studie erhobenen Daten, dass die kalziumabhängige Inhibition der Reninsekretion durch Hemmung der Adenylatzyklaseisoformen AC5 und AC6 und somit konsekutiv verminderte Generierung von cAMP vermittelt wird. Letzten Endes verbinden die Resultate dieser Arbeit Kalzium-Gehalt, cAMP-Konzentration und Reninfreisetzung von reninproduzierenden Zellen zu einem schlüssigen Gesamtkonzept und bilden eine funktionelle Basis für das Verständnis des so genannten „Kalzium-Paradoxon“ der Reninsekretion.

6. Literaturverzeichnis

Antonipillai I, and Horton R (1985). Role of extra- and intracellular calcium and calmodulin in renin release from rat kidney. *Endocrinology* 117: 601-606.

Bader M, Ganten D (2000). Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mo. Med* 78: 130-139.

Barajas L (1979). Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 236, 240-246.

Bartsch M, Zorn-Kruppa M, Kühl N, Genieser HG, Schwede F, Jastorff B (2003). Bioactivatable, Membrane-Permeant Analogs of Cyclic Nucleotides as Biological Tools for Growth Control of C6 Glioma Cells. *Biol Chem* 384: 1321-1326.

Baumbach L, and Skott O (1981). Renin release from isolated rat glomeruli: seasonal variations and effects of D600 on the response to calcium deprivation. *J Physiol* 310: 285-292.

Baxter CR, Lazzaro V, Duggin GG, Horvath JS, and Tiller DJ (1985). Stimulation of renin secretion by 8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB-8). *Biochem Pharmacol* 34: 1523-1527.

Beavo JA (1995). Cyclic nucleotid phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol* 75: 725-748.

Bek MJ, Zheng S, Xu J, Yamaguchi I, Asico LD, Sun XG, and Jose PA (2001). Differential expression of adenylyl cyclases in the rat nephron. *Kidney Int* 60: 890-899.

Boyajian CL, Garritsen A, Cooper DM (1991). Bradykinin stimulates Ca²⁺ mobilization in NCB-20 cells leading to direct inhibition of adenylyl cyclase. A novel mechanism for inhibition of cAMP production. *J Biol Chem* 266: 4995-5003.

Bührle CP, Nobiling R, Taugner R (1995). Intracellular recordings from renin-positive cells of the afferent glomerular arteriole. *Am J Physiol* 249(2 Pt 2): F272-81.

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 Suppl* 3: S125-131.

Care AD, Sherwood LM, Potts JT, Aurbach GD (1966). Perfusion of the isolated parathyroid gland of the goat and sheep. *Nature* 209(5018): 55-7.

Chabardès D, Firsov D, Aarab L, Clabecq A, Bellanger AC, Siaume-Perez S, and Elalouf JM (1996). Localisation of mRNA Encoding Ca²⁺-initiable Adenylyl Cyclases along the Renal Tubule. *J Biol Chem* 271: 19364-19271.

Chabardès D, Imbert-Teboul M, Elalouf JM (1999). Functional properties of Ca²⁺-inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca²⁺ increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signal* 11: 651-663.

- Chen Z, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Wenig G, and Iyengar (1997).** Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Gas stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14100-14104.
- Chiu T, Reid IA (1996).** Role of cyclic GMP-initiable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 793-799.
- Chiu N, Park I, and Reid IA (1996).** Stimulation of renin secretion by the phosphodiesterase IV inhibitor rolipram. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 1073-1077.
- Chiu YJ, Hu SH, and Reid IA (1999).** Inhibition of phosphodiesterase III with milrinone increases renin secretion in human subjects. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 16-19.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1): 156-159.
- Churchill PC, Rossi NF, Churchill MC, and Ellis VR (1990).** Vandate-induced inhibition of renin secretion is unrelated to inhibition of Na,K-ATPase activity. *Life Sci* 46: 1953-1959.
- Cooper DM, Karpen JW, Fagan KA, and Mons NE (1998).** Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 32: 23-51.
- Cooper DM, Mons N, and Fagan K (1994).** Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases. *Cell Signal* 6: 823-840.
- Defer N, Best-Belpomme M, and Hanoune J (2000).** Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F400-F416.
- 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: F397-F402.
- Dietz JR (1986).** Effects of calcium channel agonist on renin release from perfused rat. *Ren Physiol* 9: 279-286.
- Friis UG, Jensen BL, Aas JK, Skott O (1999).** Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ Res* 84(8): 929-936.
- Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB, and Skott O (2002).** Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circulation Research* 90: 996-1003.
- Friis UG, Jorgensen F, Andreasen D, Jensen BL, and Skott O (2003).** Molecular and functional identification of cyclic AMP-sensitive BKCa potassium channels (ZERO variant) and L-type voltage-dependent calcium channels in single rat juxtaglomerular cells. *Circ Res* 93: 213-220.

- Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A et al. (1998).** Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9003-9008.
- Gao MH, Bayat H, Roth DM, You Zhou J, Drumm J, Burhan J, Hammond H (2002).** Controlled expression of cardiac-directed adenylylcyclase type VI provides increased contractile function. *Cardiovasc Res* 56(2): 181-183.
- 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.
- Habener JF, Rosenblatt M and Potts JT (1984).** Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev* 64(3): 985-1053.
- Hackenthal E, and Taugner R (1986).** Hormonal signals and intracellular messengers for renin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 47:1-12.
- Hackenthal E, Paul M, Ganten D, and Taugner R (1990).** Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70: 1067-1116.
- Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, Shen T, Lipskaya L, Miyamoto N, Suzuki Y, and Defer N (1997).** Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 128: 179-194.
- Hanoune J, Defer N (2001).** Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 145-174.
- Holmer SR, Kaissling B, Putnik K, Pfeifer M, Krämer BK, Riegger GA, Kurtz A (1997).** Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15: 1471-1479.
- Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, and Ishikawa Y (1995).** Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* 270: 12481-12484.
- Iyengar R (1993).** Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 7: 768-775.
- 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: F604-F611.
- Jensen BL, Ellekvist P, and Skott O (1999).** Renin secretion from permeabilized juxtaglomerular cells requires a permeant cation. *Pflugers Arch* 437: 449-454.
- Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A (1997).** Adrenomedullin stimulates renin secretion and renin mRNA in mouse juxtaglomerular cells. *Hypertension* 29(5): 1148-55.
- Jensen BL, Schmid C, Kurtz A (1996).** Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 271: F659-699.
- Jones-Dombi T, and Churchill P (1993).** Bay K 8644 inhibits renin secretion in isolated perfused rat kidneys. *Life Sci* 53: 1531-1537.

- Keeton TK, and Campbell WB (1981).** The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 31: 181-227.
- King JA and Fray JC (1994).** Hydrogen and potassium regulation of (pro)renin processing and secretion. *Am J Physiol* 267: 1-12.
- King JA, Lush DJ, and Fray JC (1993).** Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am J Physiol* 265: C305-C320.
- Klar J, Sandner P, Müller MW, et al. (2002).** Cyclic cAMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* 444(3): 335-344.
- Klar J, Sigl M, Obermayer B, et al. (2005).** Calcium inhibits renin gene expression by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Hypertension* 46(6): 1340-1346.
- Kurtz A (1989).** Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmac* 113: 2-40.
- Kurtz A (1997).** Membrane and secretory properties of renal juxtaglomerular granular cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24(7): 536-40.
- 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, and Wagner C (1998).** Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275: 849-862.
- Kurtz A, and Wagner C (1999).** Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol* 202: 219-225.
- Kurtz A, Götz KH, Hamann M, Kieninger M, and Wagner C (1998a).** Stimulation of renin secretion by NO donors is related to the cAMP pathway. *Am J Physiol* 274: F709-717.
- Kurtz A, Götz KH, Hamann M, Wagner C (1998b).** Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(8): 4743-4747.
- Kurtz A, Della Bruna R, Pratz J, and Cavero I (1988a).** Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin. *J Cardiovasc Pharmacol* 12: 658-663.
- Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Milberg BI, Gnädinger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Hökfelt T, and Fischer JA (1988b).** Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J Clin Invest* 82: 538-543.
- Kurtz A, Pfeilschifter J and Bauer C (1984).** Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane?. *Biochem Biophys Res Commun* 124: 359-366.
- Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A et al. (1986).** Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol* 250: C563-571.

- Kurtz A, Schweda F (2000).** Measuring renin secretion from juxtaglomerular cells. *Methods in Molecular Medicine* 51: 391-404.
- Kurtz A, Skott O, Chegini S, and Penner R (1990).** Lack of direct evidence for a functional role of voltage-operated calcium channels in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* 416: 281-287.
- Kurtz A, Wagner C (1998).** Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275: F849-862.
- Kurtz A, Wagner C (1999).** Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S162-168.
- Loutzenhiser R, Chilton L, and Trottier G (1997).** Membrane potential measurements in renal afferent and efferent arterioles: actions of angiotensin. *Am J Physiol* 273: F307-F314.
- Marre M, Misumi J, Raemsch KD, Corvol P, and Menard J (1982).** Diuretic and natriuretic effects of nifedipine on isolated perfused rat kidneys. *J Pharmacol Exp Ther* 223: 263-270.
- Matsumura Y, Sasaki Y, Shinyama H, and Morimoto S (1985).** The calcium channel agonist, Bay K 8644, inhibits renin release from rat kidney cortical slices. *Eur J Pharmacol* 117: 369-372.
- Mokkapati R, Vyas SJ, Romero GG, Mi Z, Inoue T, Dubey RK, Gillespie DG, Stout AK, Jackson EK (1998).** Modulation by angiotensin II of isoproterenol-induced cAMP production in preglomerular microvascular smooth muscle cells from normotensive and genetically hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 287: 223-231.
- Mons N, and Cooper DM (1994).** Selective expression of one Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase in dopaminergically innervated rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 22: 236-244.
- Münter K, and Hackenthal E (1989).** The effects of endothelin on renovascular resistance and renin release. *J Hypertens Suppl* 7: S276-S277.
- NaftilanAJ, and Oparil S (1982).** The role of calcium in the control of renin release. *Hypertension* 4: 670-675.
- Nafz B, Berthold H, Ehmke H, Hackenthal E, Kirchheim HR, Persson PB (1997).** Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs. *Am J Physiol* 273: F200-205.
- Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW, Insel PA (2001).** Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 276: 42063-42069.
- Ostrom RS, Liu X, Head BP, Gregorian C, Seasholtz TM, Insel PA (2002).** Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol Pharmacol* 62: 983-992.

- Ostrom RS, Naugle JE, Hase M, Gregorian C, Swaney JS, Insel PA, Brunton LL, Meszaros JG (2003).** Angiotensin II enhances adenylyl cyclase signaling via Ca²⁺/calmodulin. Gq-Gs cross-talk regulates collagen production in cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 278: 24461-24468.
- Park CS, Hong CD, and Honeyman TW (1992).** Calcium-dependent inhibitory step in control of renin secretion. *Am J Physiol* 262: F793-798.
- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH (2004).** Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 287(2): F329-335.
- Pfeilschifter J, Kurtz A, and Bauer C (1985).** Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglceryl ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 127(3): 309-10.
- Reid IA, and Chiu YJ (1995).** Nitric oxid and the control of renin secretion. *Fund Clin Pharmac* 9: 309-323.
- Ritthaler T, Scholz H, Ackermann M, Riegger F, Kurtz A, and Krämer BK (1995).** Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 268: F39-F45.
- 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.
- Romero JC, Lahera V, Salom MG, and Biondi ML (1992).** Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxid on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2: 1371-1387.
- Roy MW, Guthire GP Jr, Holladay FP, Kotchen TA (1994).** Effects of verapamil on renin and aldosterone in the dog and rat. *Am J Physiol* 245: E410-E416.
- Schiebler TH (1996).** Histologie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York*, 4. Auflage: 566.
- Scholich K, Barbier AJ, Mullenix JB, Patel TB (1997).** Characterization of soluble forms of nonchimeric type V adenylyl cyclases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2915–2920.
- Scholz H, and Kurtz A (1992).** Disparate effects of calcium channel blockers on pressure dependence of renin secretion and flow in isolated perfused rat. *Pflugers Arch* 421: 155-162.
- Scholz H, and Kurtz A (1995).** Differential regulation of cytosolic calcium between afferent arteriol and smooth muscle cells from mouse. *Pflugers Arch* 431: 46-51.
- 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* 423: 14-20.
- Scholz H, Krämer BK, Hamann M, Kurtz A (1995).** Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand* 155: 173-182.

- Schultz C, Vajanaphanich M, Genieser HG, Jastroff B, Barrett KE, and Tsien RV (1994).** Membrane-Permeant Derivatives of Cyclic AMP Optimized for High Potency, Prolonged Activity, or Rapid Reversibility. *Mol Pharmacol* 46: 702-708.
- Sundet WD, Wang BC, Hakumaki MO, and Goetz KL (1984).** Cardiovascular and renin responses to vandate in the conscious dog: attenuation after calcium channel. *Proc Soc Exp Bio Med* 175: 185-190.
- Schweda F, Kurtz A (2004).** Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand* 181(4): 383-390.
- Schweda F, Riegger GA, Kurtz A, and Krämer BK (2000).** Store-operated calcium influx inhibits renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F170-176.
- Schwertschlag U, and Hackenthal E (1983).** Trifluoperazine antagonizes inhibition of renin release by angiotensin II. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 10: 605-608.
- Sigmund CD, Okuyama K, Ingelfinger J, Jones CA, Mullins JJ, Kane C, Kim U, Wu CZ, Kenny L, Rustum Y, Dzau VJ, Gross KW (1990).** Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J Biol Chem* 265: 19916-19922.
- Simonds WF (1999).** G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* 20: 66-73.
- Skott O (1986).** Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflugers Arch* 407: 41-45.
- Skott O, and Jensen BL (1992).** Involvement of chloride in renin secretion from isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 262: F403-F410.
- Sunahara RK, Dessauer CW, and Gilman AG (1996).** Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 461-480.
- Taugner R, Buhrlé CP, Hackenthal E, Mannek E, and Nöbiling R (1984).** Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr Nephrol* 43: 76-101.
- Taugner R, Nöbiling R, Metz R, Taugner F, Böhrlé C and Hackenthal E (1988).** Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell Tissue Res* 252(3): 687-90.
- Vandrogen R (1976).** Suppression of renin secretion in the isolated rat kidney by cycloheximid. *Eur J Pharmacol* 40: 179-181.
- Vander AJ (1967).** Control of renin release. *Physiol Rev* 47:359-382.
- Vander AJ, and Geelhoed GW (1965).** Inhibition of renin secretion by angiotensin II. *Proc Soc Exp Biol Med* 120: 399-403.
- Vandogen 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 Pharmacol* 50: 125-129.

- Wagner C, and Kurtz A (1998).** Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 437-441.
- Wagner C, Krämer BK, Hinder M, Kieninger M, and Kurtz A (1998).** T-type and L-type calcium channel blockers exert opposite effects on renin secretion and renin gene expression in conscious rats. *Br J Pharmacol* 124: 579-585.
- Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A (1998b).** Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102: 1576-82.
- Wang T, Brown MJ (2004).** Differential expression of adenylyl cyclase subtypes in human cardiovascular system. *Mol Cell Endocrinol* 223(1-2): 55-62.
- Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, Briggs JP (1990).** Effect of adenosin1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* 85: 1622-1628.
- Yoshimura M, Cooper DM (1992).** Cloning and expression of a Ca(2+)-inhibitable adenylyl cyclase from NCB-20 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 6716-6720.
- Zhang J, Sato M, Duzic E, Kubalak SW, Lanier SM, Webb JG (1997).** Adenylyl cyclase isoforms and vasopressin enhancement of agonist-stimulated cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 273: H971-H980.

7. Anhang

7.1. Publikationen

Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F (2006). The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 99(11): 1197-1206.

Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grünberger C, Kurtz A, Schweda F (2007). Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 100(4):556-563.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
f	Femto- (10^{-15})
p	Piko- (10^{-12})
n	Nano- (10^{-9})
μ	Mikro- (10^{-6})
m	Milli- (10^{-3})
g	Gramm
l	Liter
M	Molar
U	Enzymaktivität
vol.	Volumen
Vol.-%	Volumenprozent
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
FCS	fetales Kälberserum
h	Stunde
JG	juxtaglomeruläre(n)
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Anzahl der Experimente einer Versuchsreihe
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Real-time PCR
s	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

7.3. Danksagung

Am Ende dieser Dissertation ist es Zeit „Danke“ zu sagen und Menschen, die dieser Promotion zu einem erfolgreichen Abschluss verholfen haben, besonders hervorzuheben.

Mein erster und damit auch größter Dank gilt meinem Betreuer **Professor Dr. med. Frank Schweda**, in dem ich nicht nur ein wissenschaftliches sondern auch ein menschliches Vorbild gefunden habe und der mir ein wirklicher Doktor-„Vater“ war.

In besonderer Weise möchte ich auch dem Leiter des Physiologischen Institutes **Professor Dr. med. Armin Kurtz** danken, der mir ermöglicht hat über eine so spannende und lange ungeklärte Frage der Nierenphysiologie und zugleich in einem so angenehmen Arbeitsumfeld zu promovieren.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Physiologie, die ganz wesentlich zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben, bedanken. Hervorheben will ich an dieser Stelle **Susanne Lukas, Birgit Obermayer** und **Gerda Treuner**. Vielen Dank für Eure Hilfe.

Zuletzt geht mein Dank an meine ganze **Familie**, meine **Freundin**, meine **Großeltern** und an meine **Eltern**. Eure Unterstützung hat einen gewaltigen Anteil am erfolgreichen Verlauf dieser Promotion und deshalb ist diese Doktorarbeit Euch allen gewidmet.