
**Zelluläre Regulationsmechanismen der
Reningenexpression durch Vasokonstriktoren am
Beispiel von Angiotensin II und Endothelin 3**

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



vorgelegt von
Markus W.H. Müller
aus Passau
2001

Meinen Eltern

Promotionsgesuch eingereicht am: 07. Februar. 2001

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Armin Kurtz

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. S. Schneuwly (Vorsitzender)

Prof. Dr. A. Kurtz (1. Gutachter)

PD. Dr. R. Deutzmann (2. Gutachter)

Prof. Dr. G. Löffler (3. Prüfer)

I. EINLEITUNG **1**

1. RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM	1
2. RENINSYNTHESE	2
3. RENINGEN	3
4. RENINPROMOTOR.....	4
4.1 Proximale regulatorische Sequenzen	5
4.2 Enhancer-Strukturen	6
4.3 Silencer-Strukturen	7
5. INTRAZELLULÄRE REGULATION DER RENINFREISETZUNG UND RENINSYNTHESE.....	7
5.1 Juxtaglomeruläre Epitheloidzellen (JG-Zellen).....	7
5.2 Signaltransduktion	8
5.2.1 cAMP-Signaltransduktionsweg	9
5.2.2 cGMP-Signaltransduktionsweg	9
5.2.3 Kalzium.....	10
5.2.4 Proteinkinase C	12
6. PHYSIOLOGISCHE REGULATION DER RENINFREISETZUNG UND RENINGENEXPRESSION	12
6.1 Intrarenaler Blutdruck	13
6.2 Kochsalzbilanz des Körpers.....	14
6.3 Sympathisches Nervensystem.....	15
6.4 Humorale und lokal synthetisierte Faktoren	15
7. EINFLUSS VASOKONSTRIKTORISCHER HORMONE AUF DIE RENINSEKRETION UND RENINGENEXPRESSION	16
7.1 Angiotensin II	16
7.2 Endotheline	18
8. FRAGESTELLUNG.....	19

II. MATERIAL UND METHODEN **20**

1. GERÄTE	20
2. MATERIALIEN.....	20

2.1 Verbrauchsmaterialien	20
2.2 Chemikalien	21
2.3 Enzyme	22
2.4 Vektoren	22
2.5 Filme und Photochemikalien	22
2.6 Lösungen und Puffer	22
2.6.1 Isolierung von Total-RNA	22
2.6.2 RT / PCR und Klonierung	23
2.6.3 Medien und Agarplatten	24
2.6.4 In vitro Transkription	24
2.6.5 RNase-Protection-Assay	24
2.7 Kits	25
3. ZELLKULTUR	25
4. ISOLIERUNG VON TOTAL RNA	26
4.1 Schutzmaßnahmen	26
4.2 Durchführung der RNA-Isolierung	26
4.3 Bestimmung der Ausbeute	27
4.4 Reinheit und Qualität der isolierten RNA	28
5. QUANTIFIZIERUNG DER MRNA MITTELS DES RNASE PROTECTION ASSAYS	29
5.1 Durchführung des RNase Protection Assays	30
5.1.1 Verwendete Plasmide	30
5.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Prep)	30
5.1.3 Linearisierung der Plasmide	31
5.1.4 Herstellung einer radioaktiven cRNA Sonde	32
5.1.5 Hybridisierung der RNA-Proben mit der cRNA-Sonde	33
5.1.6 Durchführung des RNase Protection Assays	33
5.1.7 Gelelektrophorese	33
5.1.8 Entwicklung der Röntgenfilme und Auswertung der Signale	34
6. BESTIMMUNG DER RENINAKTIVITÄT	34
7. BESTIMMUNG DER PROTEINKINASE C- AKTIVITÄT	35
8. KLONIERUNG DER RENINPROMOTORFRAGMENTE	35
8.1 Auswahl der Abschnitte und Primersequenzen	36
8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36

8.3 TOPO TA long template cloning [®] Methode (Invitrogen).....	38
8.3.1 Aufreinigung der Fragmente	38
8.3.2 TOPO XL PCR cloning [™] -Reaktion	39
8.3.3 One Shot Transformationsreaktion	39
8.3.4 Selektion positiver Klone.....	40
8.3.5 Animpfen von LB-Kulturen.....	40
8.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep).....	40
8.3.7 Kontrollverdau der Plasmide	41
8.3.8 Herstellung von Glycerinkulturen.....	41
8.3.9 Sequenzierung der Inserts	41
8.4 Umklonierung der Ren-1 ^C Reninpromotorfragmente in Luciferase-Reportervektoren	41
8.4.1 Vorbereitung der Vektoren und Inserts.....	42
8.4.1.1 Restriktionsverdau der Vektoren und Inserts.....	43
8.4.1.2 Kontrolle der Vektoren auf vollständigen Restriktionsverdau	43
8.4.1.3 Aufreinigung der vorbereiteten Vektoren und Inserts.....	43
8.4.2 Ligationsreaktion	44
8.4.3 Transformation.....	44
8.4.3.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	44
8.4.3.2 Transformation von kompetenten E.coli mit ligiertem Vektor.....	45
8.4.3.3 Selektion positiver Klone und anschließende Arbeitsschritte	45
8.5 Aufzeichnungsprotokolle	46
9. TRANSFEKTIONEN	46
9.1 Transfektionsreagenzien	46
9.2 Durchführung der Transfektion	47
9.3 Ernte der Zellen.....	48
9.4 Dual Luciferase Assay (Promega).....	48
10. STATISTISCHE AUSWERTUNG	49

III. ERGEBNISSE **50**

1. EINFLUSS VON ANGIOTENSIN II AUF DIE RENINGENEXPRESSION UND RENINSYNTHESE IN AS4.1 ZELLEN	50
1.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Renin mRNA Abundanz.....	50

1.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung.....	50
1.1.2 Zeitverlauf der Angiotensin II Wirkung	51
1.2 Signaltransduktion von Angiotensin II	51
1.2.1 Bestimmung der Proteinkinase C Aktivität	52
1.2.2 Einfluss einer Proteinkinase C Inhibierung auf die Angiotensin II Effekte	53
1.2.2.1 Einfluss einer direkten PKC Hemmung unter basalen Bedingungen	53
1.2.2.2 Dosis-Wirkungsbeziehung von Bisindolylmaleimide I auf die Angiotensin II Effekte	53
1.2.2.3 Zeitverlauf der Bisindolylmaleimide I Wirkung auf die Angiotensin II Effekte ...	54
1.2.3 Direkte Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolster	55
1.2.3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung.....	55
1.2.3.2 Zeitverlauf der PMA Wirkung.....	56
1.2.3.3 Dosis-Wirkungsbeziehung von Bisindolylmaleimide I auf die PMA Effekte.....	57
1.2.3.4 Zeitverlauf der Bisindolylmaleimide I Wirkung auf die PMA Effekte	58
1.3 Einfluss von Angiotensin II auf die Reninsynthese	58
1.4 Wirkungsmechanismus von Angiotensin II.....	59
1.4.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Renin mRNA Stabilität.....	59
1.4.2 Transkriptionelle Regulationsmechanismen.....	61
1.4.2.1 Klonierung verschiedener Ren-1 ^C Promotorfragmente	61
1.4.2.2 Etablierung des Transfektionssystems.....	63
1.4.2.3 Promotorstudien.....	65
1.4.2.4 Deletionsstudien	66
1.5 Zusammenfassung	68
2. EINFLUSS VON ENDOTHELIN 3 AUF DIE RENINGENEXPRESSION UND RENINSYNTHESE IN AS4.1 ZELLEN	69
2.1 Einfluss von Endothelin 3 auf die Renin mRNA Abundanz	69
2.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung.....	69
2.1.2 Zeitverlauf der Endothelin 3 Wirkung.....	70
2.2 Signaltransduktion von Endothelin 3	71
2.2.1 Messung der Proteinkinase C Aktivität	71
2.2.2 Einfluss einer Proteinkinase C Inhibierung auf die Endothelin 3 Wirkung	72
2.2.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung von Bisindolylmaleimide I auf die Endothelin 3 Effekte	72

2.2.2.2 Zeitverlauf der Bisindolylmaleimide I Wirkung auf die Endothelin 3 Effekte.....	73
2.3 Einfluss von Endothelin 3 auf die Reninsynthese.....	73
2.4 Wirkungsmechanismus von Endothelin 3	74
2.4.1 Einfluss von Endothelin 3 auf die Renin mRNA Stabilität	74
2.4.2 Transkriptionelle Regulationsmechanismen	75
2.4.2.1 Promotorstudien.....	75
2.4.2.2 Deletionsstudien.....	76
2.5 Zusammenfassung.....	77

IV. DISKUSSION	79
-----------------------	-----------

V. ZUSAMMENFASSUNG	88
---------------------------	-----------

VI. LITERATUR	90
----------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µmol	Mikromol
4α-PDD	4α-Phorbol-12,13-didecanoate
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin Converting Enzym
Amp	Ampicillin
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
API	Aktivator-Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
BIM	Bisindolylmaleimide I
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophat
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CRE	cAMP response element
cRNA	copy Ribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GC	Guanylatzyklase
h	Stunde
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JG	juxtaglomerulär
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertiani
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nmol	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid, Nitric Oxide
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA Elektrophoresepuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	units
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen

I. Einleitung

1. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutdrucks und des Extrazellulärvolumens. Das RAAS besteht aus einer Kaskade von enzymatisch katalysierten Reaktionen, die sowohl das Blutvolumen als auch den Elektrolythaushalt des Organismus beeinflussen und somit eine Variation des Blutdrucks ermöglichen. Von großer Bedeutung ist das RAAS durch seine pathophysiologische Schlüsselrolle bei kardiovaskulären Erkrankungen wie z.B. der Hypertonie und Herzinsuffizienz. Nach heutigem Kenntnisstand kann das RAAS in ein humorales, zirkulierendes und in lokale, in den Organen lokalisierte, parakrine bzw. autokrine Systeme eingeteilt werden (Dzau und Gibbons, 1987; Dzau, 1993). Die Aktivität des systemischen RAAS wird maßgeblich von der Reninfreisetzungsrate aus den renalen juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) bestimmt.

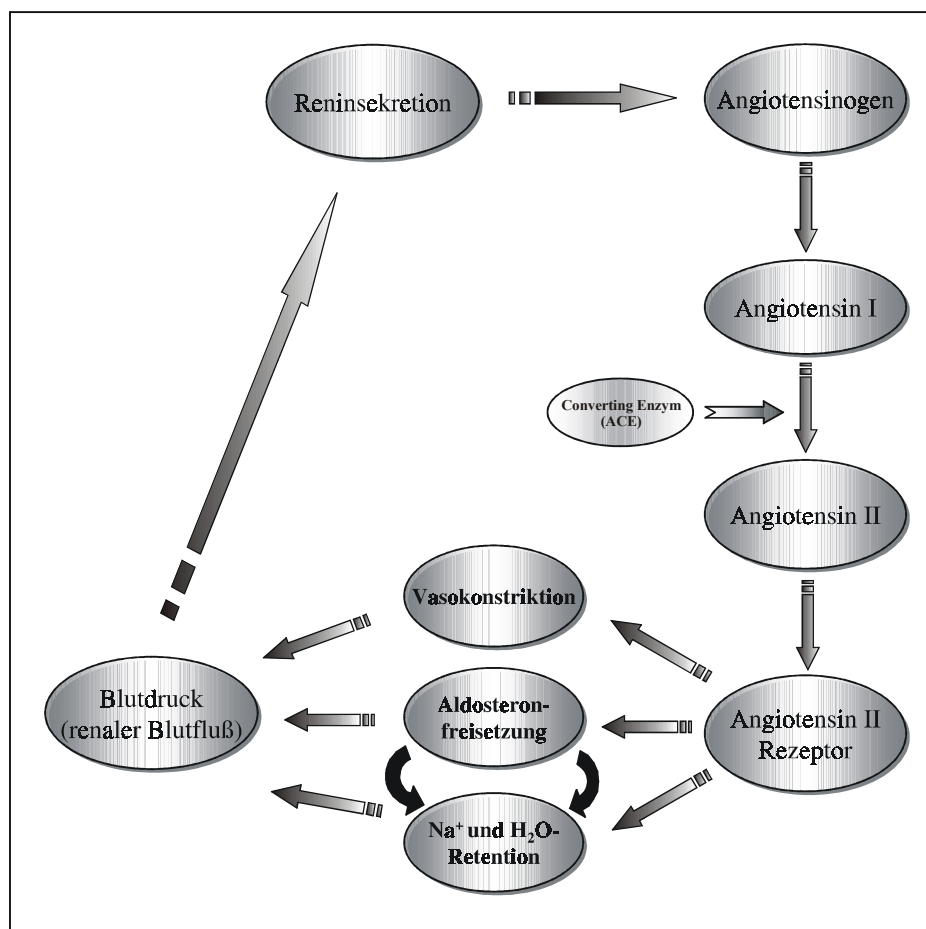


Abb.1: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Schlüsselenzym der RAAS-Reaktionskaskade ist die Aspartylprotease Renin, ein monomeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Renin spaltet im ersten Reaktionsschritt der Kaskade aus Angiotensinogen (ANG-0), einem im Blutplasma zirkulierenden, vorwiegend in der Leber synthetisierten α -Globulin, das Decapeptid Angiotensin I (ANG I) ab. Angiotensin I ist biologisch inaktiv und wird durch das ubiquitär vorkommende, endothelständige Angiotensin Converting Enzym (ACE) durch hydrolytische Abspaltung zweier C-terminaler Aminosäuren (His-Leu) in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt, den biologischen Effektor des Systems. Angiotensin II wirkt vasokonstriktorisch und stimuliert in der Nebenniere die Synthese und Sekretion des Steroidhormons Aldosteron. Aldosteron führt in der Niere zu einer verstärkten Rückresorption von Wasser und Kochsalz und bewirkt somit eine Erhöhung des Blutvolumens, sowie eine Blutdrucksteigerung (Hackenthal, 1990). Da unter physiologischen Bedingungen weder die Konzentration an Angiotensinogen noch an Converting Enzym limitierend ist, wird die Aktivität des RAAS hauptsächlich von der Reninsekretionsrate aus den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) bestimmt (Kurtz A., 1989).

Die physiologische Aufgabe des RAAS besteht hauptsächlich darin, einem Blutdruckabfall sowie einer Reduktion des Extrazellulärvolumens entgegenzuwirken. Das RAAS wirkt dabei im Sinne eines negativen Feedback-Systems, d.h. dass sowohl ein erhöhter intrarenaler Blutdruck als auch eine erhöhte Kochsalzzufuhr die Reninfreisetzung und die Reninsynthese in den JG-Zellen hemmt (Hackenthal, 1990).

2. Reninsynthese

Die Niere ist die Hauptproduktionsstätte, in der Renin in einer aktiven Form hergestellt und in regulierter Weise sezerniert wird. Daneben konnte in den letzten Jahren in verschiedenen Geweben, wie z.B. Blutgefäßen, exo- und endokrinen Drüsen, Placenta und Mesangialzellen eine geringe Reninsyntheserate nachgewiesen werden (Panthier et al., 1982; Catanzaro et al., 1983; Cambell et al., 1987; Chansel et al., 1987).

Die Reninsynthese erfolgt in der Niere in den renalen juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984). Das Renin wird in den JG-Zellen als Präzymogen (Preprorenin mit 401 AS) transkribiert und translatiert (Pratt et al., 1983; Imai et al., 1983). Nach Translokation und Abspaltung eines 20 Aminosäuren langen

Signalpeptids im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums entsteht das enzymatisch inaktive Prorenin (381 AS), das entweder teilweise konstitutiv sezerniert wird, oder nach Glykosylierung im Golgi-Apparat mit Mannose-6-phosphat-Resten in lysosomenähnliche, sekretorische Vesikel verpackt wird. Die Glykosylierung des Renins ist hierbei nicht nur für die Verpackung in sekretorische Vesikel verantwortlich, sondern auch für die Ausbildung der Vesikel notwendig (Clark et al., 1997). In diesen Vesikeln erfolgt die Aktivierung zum enzymatisch aktiven Renin durch Verkürzung des N-Terminus um 46 Aminosäuren (Panthier et al., 1982; Catanzaro et al., 1983; Hirose et al., 1985; Dzau et al., 1988). Die hierfür verantwortliche Prohormon Convertase ist bis dato nicht näher charakterisiert, jedoch werden Kandidaten wie Kallikrein (Kikkawa et al., 1998), Cathepsin B (Hackenthal et al., 1990; Neves et al., 1996; Jutras et al., 1999) bzw. PC5 (Laframboise et al., 1997) in diesem Zusammenhang diskutiert. Die Freisetzung des Renins erfolgt mittels regulierter Exocytose durch Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran (Taugner et al. 1984; Skøtt et al., 1986).

3. Reningen

Die Struktur des Reningens ist im Laufe der letzten Jahre in verschiedenen Spezies aufgeklärt und analysiert worden (Panthier et al., 1982; Hardman et al., 1984; Hobart et al., 1984; Burnham et al., 1987; Fukamizu et al., 1988; Hackenthal et al., 1990).

Der Sequenzvergleich der einzelnen Reningene zeigte eine Reihe homologer Strukturelemente auf. So setzt sich das Reningen von Maus und Ratte aus 9 Exons mit 8 trennenden Introns zusammen, wohingegen bei Mensch und bei Schaf ein zusätzliches 9 Basenpaar kleines Exon (Exon 5A) nachgewiesen wurde (Hardmann et al., 1984; Horbart et al., 1984; Aldred et al., 1993).

Mäuse weisen als einzige Säugetiergattung die Existenz von zwei für Renin codierende Genorte auf. So besitzen manche Mäusestämme ein als Ren-1^C bezeichnetes Reningen, wohingegen andere Stämme zwei Reningene, Ren-1^D bzw. Ren-2 besitzen, deren Existenz sich aus einer während der evolutionären Entwicklung stattgefundenen Genduplikation herleiten lässt (Morris et al., 1992). Das Genprodukt des Ren-2 Gens, das vorwiegend in den submandibulären Drüsen exprimiert wird (Kon et al., 1999), besitzt kein Glykosylierungssignal und wird deshalb vornehmlich konstitutiv sezerniert (Clark et al., 1997).

4. Reninpromotor

Der Begriff Promotor bezeichnet den 5'-flankierenden Bereich eines Gens, von dem aus die Transkription, d.h. die Synthese der mRNA des nachgeschalteten Gens gesteuert wird. Der Promotor eines Gens wird als sogenanntes cis-wirkendes DNA-Element bezeichnet, das im Gegensatz zu Enhancer- bzw. Silencerstrukturen nur die Transkriptionsaktivität von Genen kontrolliert, die in unmittelbarer 3'-Richtung auf dem gleichen DNA-Abschnitt liegen.

Anhand zahlreicher transgener Tiermodelle und Promotorstudien konnten im 5'-flankierenden Bereich des Reningens verschiedene, für die Transkriptionsaktivität des Reningens verantwortliche, Transkriptionsfaktoren bindende Konsensussequenzen identifiziert werden.

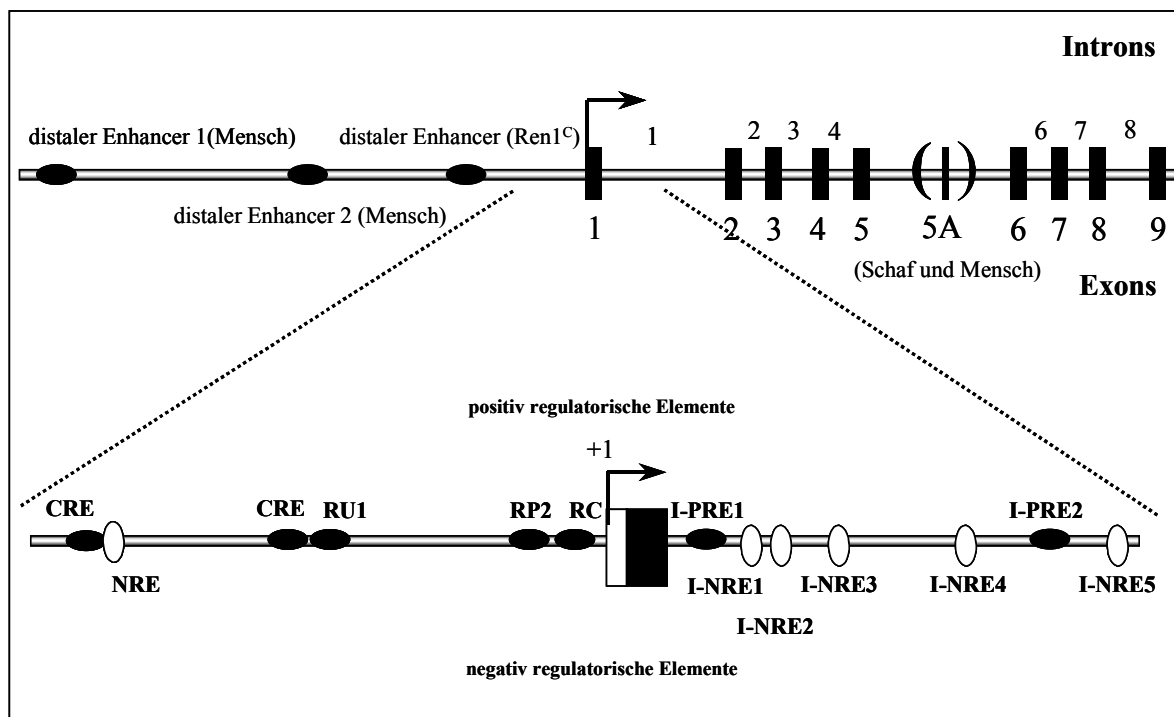




Abb.2: Konsensussequenzen im Reninpromotor

CRE:	cAMP response Element	I-PRE:	im Intron liegendes positiv regulatorisches Element
NRE:	negativ regulatorisches Element	RC:	putative AP1-binding site (-36 bis -20) im Ren-1 ^C -Promotor
I-NRE:	im Intron liegendes negativ regulatorisches Element	RP2:	im Ren-1 ^C Promotor lokalisiertes, an der cAMP-Regulation beteiligtes positiv regulatorisches Element
PRE:	positiv regulatorisches Element	+1:	Transkriptionsstartpunkt
	Exon (1-5)		nichttranslatierter Exonbereich

4.1 Proximale regulatorische Sequenzen

Das cAMP response-element stellt wohl die prominenteste Konsensussequenz des Reninpromotors dar. So konnte bei mehreren Spezies die Existenz verschiedener cAMP response-element (CRE)-Konsensussequenzen in der proximalen Promotorregion nachgewiesen werden. Beim humanen Reningen wurde ein in Chorion Zellen (Germain et al., 1996; 1997) und Calu-6 Lungenkarzinom Zellen (Germain et al., 1997, Ying et al., 1997), durch Interaktion mit einem CRE-binding Protein (CREB) funktionell wirksames CRE-Bindungsmotiv an der Position -226 bis -219 des Reninpromotors lokalisiert. Die Ausprägung des CRE-Elements ist jedoch untypisch und benötigt für die Stimulation des Reninpromotors durch cAMP ein weiteres, an Position -77 bis -67 lokalisiertes, zu den Bindungssequenzen der POU-Domäne bindenden Transkriptionsfaktoren homologes DNA-Element (Pit1-Bindungsstelle) (Sun et al., 1993, 1994; Borensztein et al., 1994; Gilbert et al., 1994; Germain et al., 1996, 1997a, 1997b; Ying et al., 1997). Ein analoges, ebenfalls an der cAMP-Regulation beteiligtes Bindungsmotiv (RP-2 Element, Position -75 bis -47) wurde in der proximalen Promotorregion des Maus Ren-1^C Gens nachgewiesen (Tamura et al., 1993, 1994). Diese Sequenz vermittelt eine stimulatorische Wirkung auf die Reningenexpression mittels eines Produkts des Retinoblastom-Gens (RB; Tamura et al., 1997) und scheint zusätzlich an der durch ein distales Enhancer Element (Petrovic et al., 1996) gesteuerten, gewebespezifischen Expression beteiligt zu sein.

Im Ren-1^D Promotor konnte ein weiteres im distalen Promotorbereich (Position -625 bis -599) liegendes CRE-Motiv identifiziert werden. Dieses CRE-Element scheint an der gewebespezifischen Reningenexpression durch Interaktion mit einer, diese Sequenz überlappenden negativ regulatorisch wirkenden Struktur (NRE, -607 bis -599) beteiligt zu sein (Horiuchi et al., 1991; 1993; Barrett et al., 1992; Yamada et al., 1995; Tomita et al., 2000). So führt in JG-Zellen ein erhöhter cAMP-Spiegel zur Stimulation der Reningenexpression durch Bindung des CRE-binding Proteins an die CRE-Sequenz mit gleichzeitiger Verdrängung des NRE-binding Proteins von der NRE-Sequenz. In anderen Geweben wird das CRE-binding Protein (CREB) durch gewebespezifische Faktoren gebunden und inaktiviert, so dass eine Transkription durch die Wirkung des NRE-binding Proteins gehemmt wird. Dieser Mechanismus erklärt auch die hohe, cAMP-unabhängige Transkriptionsaktivität des Ren-2 Gens in den submandibulären Drüsen, da bei diesem Gen die NRE-Funktion durch Insertion eines 150 bp langen DNA-Fragments inaktiviert ist (Yamada et al., 1995).

Der starke Anstieg der Renin mRNA Abundanz bei cAMP Stimulation kann jedoch nicht ausschließlich durch eine Steigerung der Transkriptionsaktivität erklärt werden. So zeigten Untersuchungen an JG-Zellen (Chen et al., 1993) und Calu-6 Zellen (Lang et al., 1996; Sinn et al., 1999), dass cAMP zu einer Verdreifachung der Renin mRNA Halbwertszeit führt, wobei jedoch der hierfür verantwortliche Stabilisierungsmechanismus noch unbekannt ist.

Tamura et al. (1993, 1998) konnten zusätzlich die Existenz einer AP1-Bindungsstelle im proximalen Ren-1^C Promotor (RC-Element, -36 bis -20) nachweisen. Diese c-Jun bindende Sequenz könnte an der basalen Reningenexpression beteiligt sein.

4.2 Enhancer-Strukturen

Untersuchungen mit transgenen Tiermodellen und Transfektionsstudien zeigten, dass sowohl DNA-Sequenzen im 5'-flankierenden Bereich als auch in der transkribierten Region des Renings für die korrekte gewebespezifische Expression benötigt werden.

So zeigten transgene Mäuse mit Fusionskonstrukten (SV40 T-Antigen) von 2.5 kb (Tronik et al., 1987, 1988) bzw. 5.3 kb (Mullins et al., 1989) der Promotorregion in Kombination mit allen Exon- und Intronstrukturen bzw. mit einem Konstrukt von 4.6 kb des Promotors und einem Reportergen (SV40 T-Antigen) eine korrekte gewebespezifische Expression des Transgens (Sigmund et al., 1990) in den für die Reningenexpression beschriebenen Organen wie Niere, Genitalorganen, submandibulären Drüsen und den Nebennieren. Im Gegensatz dazu entwickelten transgene Tiere mit einem Fusionskonstrukt von 2.5 kb der Promotorregion und einem SV40 T-Antigen ohne zusätzliche Exon- und Intronsequenzen ein willkürliches Expressionsmuster ohne Ausbildung von Renin-produzierenden Tumoren (Sola et al., 1989).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass sowohl Strukturen im Bereich der ersten 2.5 kb des Reninpromotors als auch zusätzliche in der transkribierten Region lokalisierte Elemente für die gewebespezifische Expression des Renins verantwortlich sind.

Weitere funktionell wirksame Enhancerstrukturen konnten sowohl im Maus Ren-1^C Gen an Position -2866 bis -2625 (Petrovic et al., 1996) als auch im humanen Reningen an Position -5777 bis -5552 (Germain et al., 1998) sowie 12 kb in 5'-Richtung vom humanen Exon I (Yan et al. 1997, Shi et al. 1999) identifiziert werden.

4.3 Silencer-Strukturen

Zusätzlich wurden transkriptionell wirksame Silencerelemente im transkribierten Bereich des Reningens identifiziert. Im Intron I des Reningens, das speziell im Bereich der ersten 120 Basenpaare einen hohen Homologiegrad zwischen den einzelnen Spezies aufweist, konnten verschiedene Transkriptionsfaktoren bindende Sequenzen nachgewiesen werden (Germain et al., 1999, Voigtländer et al., 1999).

So konnte gezeigt werden, dass bei der Ratte (Voigtländer et al., 1995) und beim Menschen (Germain et al., 1999, Lang et al., 1996) das Intron I eine Silencerfunktion auf transfizierte Reninpromotorkonstrukte ausübt. Für die Ratte wurde eine komplexe Struktur aus mindestens 5 negativen und 2 positiven regulatorischen Elementen identifiziert, wobei jedoch ihre Bedeutung für die gewebespezifische Expression des Renins und ihre Regulationswirkung auf das Reningen noch aufgeklärt werden muss (Voigtländer et al., 1999).

5. Intrazelluläre Regulation der Reninfreisetzung und Reninsynthese

5.1 Juxtaglomeruläre Epitheloidzellen (JG-Zellen)

In der Niere wird das Renin hauptsächlich in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984) gebildet. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um, durch metaplastische Transformation reversibel umgewandelte, glatte Muskelzellen, die in unmittelbarer Nähe des Glomerulus in der Tunica media der afferenten Arteriolen lokalisiert sind. Die Anzahl an JG-Zellen ist nicht fest determiniert und kann variabel je nach Bedarf reguliert werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass es bei einer langanhaltenden Stimulation des Reninsystems, z.B. Hemmung der endogenen ANG II Wirkung, zu einer Vermehrung der reninproduzierenden Zellen in den afferenten Arteriolen durch eine Rekrutierung von glatten Muskelzellen kommt (Rekrutierungsvorgang; Taugner et al., 1984). Eine Supprimierung des Reninsystems hingegen führt zu einer Abnahme an reninproduzierenden JG-Zellen.

Die JG-Zellen zeigen noch die für glatte Muskelzellen typischen Aktin- bzw. Myosinfilamente, die zu einem dichten Netz direkt unter der Plasmamembran konzentriert sind (Taugner et al., 1984). Zusätzlich haben sie noch, die für sekretorische Zellen

typischen Charakteristika, wie einen stark ausgebildeten Golgi-Apparat, rauhes Endoplasmatisches Reticulum und sekretorische, hier im speziellen reninhaltige Speichervesikel (Barajas, 1979).

5.2 Signaltransduktion

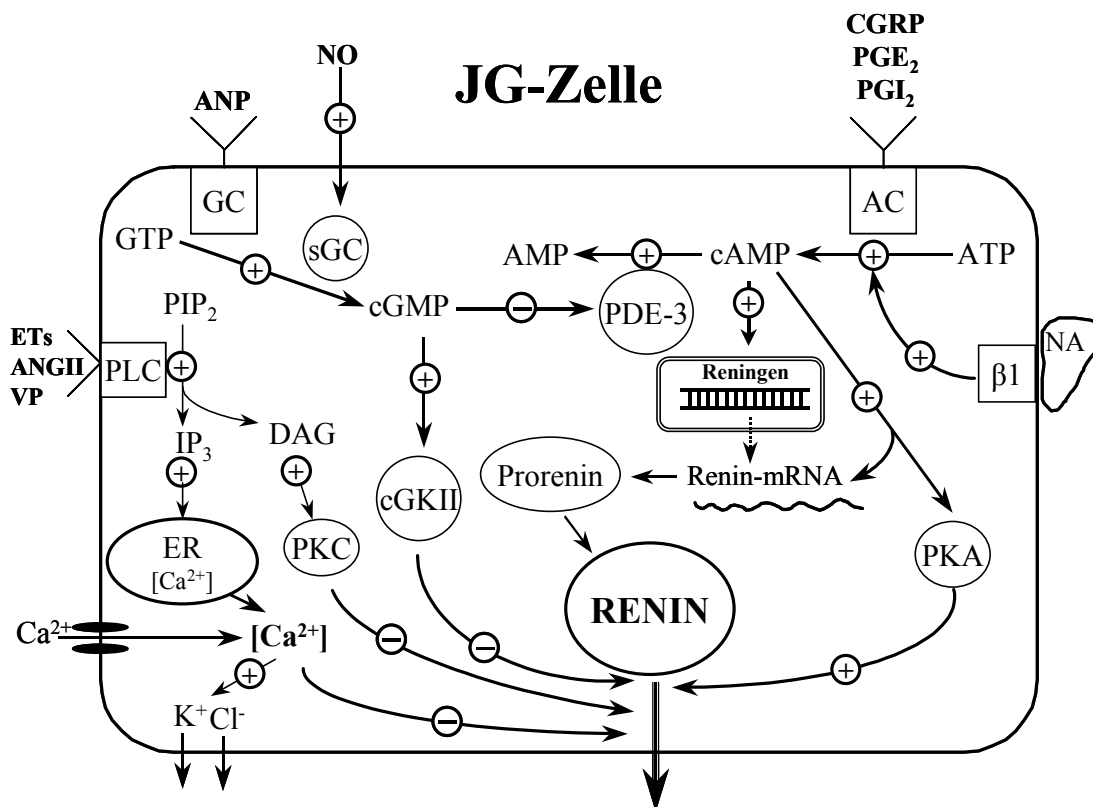


Abb.3: Intrazelluläre Regulationsmechanismen der Reninfreisetzung und -Synthese

β1: β₁-Rezeptor

AC: Adenylatzyklase

ANGII: Angiotensin II

ANP: Atrial Natriuretisches Peptid

cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat

cGKII: cGMP-abhängige Proteinkinase II

cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat

CGRP: Calcitonin gene related peptide

DAG: Diacylglycerol

ER: Endoplasmatisches Retikulum

ET: Endothelin

GC: Guanylatzyklase

IP₃: Inositoltrisphosphat

NA: Noradrenalin

NO: Stickstoffmonoxid

PDE-3: Phosphodiesterase-3

PGE₂: Prostaglandin E₂

PGI₂: Prostaglandin I₂

PIP₂: Phosphatidylinositolbisphosphat

PKC: Proteinkinase C

sGC: soluble Guanylatzyklase

VP: Vasopressin

Die Reninfreisetzung durch regulierte Exozytose ist im Detail noch nicht hinreichend aufgeklärt und verstanden. Man kann jedoch sagen, dass eine Regulation in den JG-Zellen insbesondere durch second messenger Systeme wie zyklisches AMP (cAMP), zyklisches GMP (cGMP) und Kalzium als auch durch osmotische Einflüsse, Änderungen des Zellmembranpotentials sowie durch eine Aktivierung der Proteinkinase C stattfindet.

5.2.1 cAMP-Signaltransduktionsweg

Cyclisches AMP ist der am besten charakterisierte Stimulator der Reninsekretion und Reningenexpression in JG-Zellen. Der second messenger cAMP wird durch die Adenylatzyklase aus ATP generiert. Die Aktivierung der Adenylatzyklase erfolgt z.B. durch β -adrenerge Aktivatoren, Calcitonin-related peptide (CGRP), Prostaglandin E₂ (PGE₂) bzw. Prostazyklin (Kurtz, 1989).

cAMP stimuliert sowohl die Reninfreisetzung als auch die Reningenexpression, indem es die Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern blockiert und die Kalziumpermeabilität der Zellmembran verringert (Kurtz, 1989; DellaBruna et al., 1993). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der cAMP Wirkung auf die Reninsekretion bzw. Reningenexpression, so handelt es sich bei der Expression mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 3-4 Stunden um einen, im Vergleich mit der raschen Stimulation der Reninsekretion (innerhalb weniger Minuten) relativ langsamen Wirkungsmechanismus. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass cAMP nicht nur einen, mittels eines cAMP response-element vermittelten transkriptionellen Effekt (Nakamura et al., 1989; Horiuchi et al., 1991), sondern auch einen Stabilisierungseffekt auf die Renin mRNA hat (Chen et al., 1993; Lang et al., 1996; Sinn et al., 1999).

Es existieren Hinweise darauf, dass cAMP die Reninsekretion durch eine Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A stimuliert, die die Reninsekretion durch Schwellung der Vesikel (Aktivierung der Protonenpumpe) und/oder durch eine Schwächung des unter der Plasmamembran lokalisierten Aktin-Myosin Schildes stimuliert.

5.2.2 cGMP-Signaltransduktionsweg

Cyclo GMP ist ebenfalls ein second messenger der in sekretorischen Zellen Exozytosevorgänge regulieren kann. cGMP gilt als Relaxans von vaskulären glatten Muskelzellen und scheint zusätzlich die Reninfreisetzung aus JG-Zellen zu regulieren. Eine Aktivierung der Guanylatzyklase durch NO (EDRF) bzw. durch das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) und ein daraus resultierender erhöhter cGMP-Spiegel kann in *in vivo*- als auch in *in vitro*-Situationen, sowohl stimulatorisch als auch inhibitorisch auf die Reninsekretion wirken. Dies legt die Vermutung nahe, dass hier zwei voneinander unabhängige Signaltransduktionswege vorliegen, die in ihrer Summation auf die

Reninsekretion wirken. Bislang konnten in JG-Zellen zwei verschiedene cGMP-Wirkungsmechanismen aufgeklärt werden (Schmidt et al., 1993):

Der erste Mechanismus läuft über eine Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen cGKI bzw. cGKII und der zweite indirekt über den cAMP-Weg durch Transaktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (Butt et al., 1992) oder durch Inhibierung bzw. Aktivierung der cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen (Beavo, 1995). Versuche mit cGKI- bzw. cGKII-knockout Mäusen und membranpermeablen cGMP Analoga lassen den Schluss zu, dass cGMP hauptsächlich durch eine Aktivierung der cGKII zu einer Hemmung der Reninfreisetzung führt. (Wagner et al., 1998; Kurtz et al., 1998). Die Proteinkinase cGKII scheint auf zellulärer Ebene als Antagonist zur cAMP induzierten Stimulation der Reninsekretion zu wirken.

Die bereits erwähnte stimulatorische Wirkung des cGMP kann durch eine Hemmung des cAMP-Abbaus mittels Blockade der Phosphodiesterase-3 (PDE-3) (Beavo; 1995) und einem daraus resultierenden, auf die Reninsekretion stimulierend wirkenden, erhöhten cAMP-Spiegel (Chiu und Reid; 1996; Kurtz et al., 1998) erklärt werden.

Untersuchungen mit cGMP Analoga konnten keinen Einfluss der cGKII auf die Reningenexpression feststellen (DellaBruna et al., 1996).

5.2.3 Kalzium

Die cytosolische Kalziumkonzentration hat eine wichtige Regulationsfunktion bei der intrazellulären Steuerung der Reninsekretion aus JG-Zellen. Im Gegensatz zu anderen sekretorischen Zellen, bei denen Kalzium allein oder in Kombination mit der Proteinkinase C Sekretionsvorgänge initiiert, fördert oder aufrecht erhält, führt ein in JG-Zellen erhöhter intrazellulärer Kalzium-Spiegel sowohl zu einer Hemmung der Reninfreisetzung als auch der Reningenexpression (DellaBruna et al., 1995). Hormone, wie z.B. Endothelin, ANG II (Hackenthal et al., 1990) oder Vasopressin (Kurtz et al., 1986), die durch Aktivierung der Phospholipase C zu einer intrazellulären Kalziummobilisierung und Aktivierung der Proteinkinase C führen, inhibieren die Reninsekretion in JG-Zellen.

Die Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration hingegen hat einen dualen Effekt auf die Sekretionsaktivität der JG-Zellen. So führt bei isolierten JG-Zellen eine erhöhte extrazelluläre Kalziumkonzentration zu einer transienten Hemmung der Reninsekretion, die von einer Stimulation gefolgt wird (Schricker et al., 1993; DellaBruna et al., 1995). Andererseits stimuliert eine Reduktion der extrazellulären Kalziumkonzentration bzw. eine

Blockade der Kalziumkanäle oder eine Hemmung der intrazellulären Kalziumfreisetzung (Antonipillai u. Horton, 1985; Churchill, 1985) die Reninsekretion. Eine Erhöhung des extrazellulären Kalzium-Spiegels inhibiert auch die Reningenexpression in isolierten JG-Zellen (DellaBruna et al., 1995), wohingegen eine Reduktion der extrazellulären Kalziumkonzentration nach heutigem Kenntnisstand keinen Effekt auf die Reningenexpression hat.

Dieses Phänomen der Hemmung von Exozytosevorgängen, bedingt durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, wird als „Kalzium-Paradoxon“ der Reninfreisetzung bezeichnet. Dieses Phänomen könnte über eine Kalzium-regulierte Veränderung des JG-Zellvolumens erklärt werden. Intrazelluläres Kalzium führt über eine Aktivierung von Kalzium-gesteuerten Chlorid- und Kaliumkanälen (Kurtz und Penner, 1989) zu einem Ausstrom von KCl und Wasser. Dieser substanzielle Verlust an intrazellulären, osmotisch wirksamen Elektrolyten würde zu einem Schrumpfen der Zellen führen (Kurtz et al., 1993). Eine Reduktion des Zellvolumens inhibiert die Reninsekretion in JG-Zellen (Skøtt, 1988).

Allgemein kann man sagen, dass osmotische Kräfte einen bedeutenden, regulatorischen Einfluss auf die Reninfreisetzung in isolierten JG-Zellen haben. Während ein Anstieg der extrazellulären Osmolalität zu einer Inhibierung der Reninsekretion führt, stimuliert eine Hypoosmolalität die Reninsekretion, indem Wasser dem Konzentrationsgefälle folgend in die Zellen einströmt, die sekretorischen Vesikel anschwellen und infolge mit der Plasmamembran fusionieren (Skøtt et al., 1988; Kurtz u. Scholz, 1993).

Die Veränderung der intrazellulären Ionenkonzentration kann jedoch nicht die einzige Ursache des „Kalzium-Paradoxons“ sein. So kann die Hemmung der Reninfreisetzung durch Calmodulin nicht durch eine Veränderung der Ionenkonzentration erklärt werden. Als möglicher Erklärungsansatz wird eine Interaktion von Kalzium/Calmodulin mit dem, direkt unter der Plasmamembran liegenden Myosinfilamentnetz diskutiert (Aktivierung der Myosin Light Chain Kinase; Park et al., 1996). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration könnte dabei das Myosinfilamentnetz stabilisieren und somit einer Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran entgegenwirken (Taugner et al., 1988; Kurtz et al., 1990). Andererseits könnten auch durch Calmodulin gesteuerte Mechanismen zu einer Hemmung des Vesikelschwellens führen (Park et al., 1992) und somit die Reninfreisetzung inhibieren.

5.2.4 Proteinkinase C

Zahlreiche kalziummobilisierende Hormone und Peptide, wie Angiotensin II, Endothelin, Noradrenalin und Platelet-Activating Factor (PAF) stimulieren die Phospholipase C. Die Phospholipase C katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 führt zu einem vorübergehenden Anstieg der cytoplasmatischen Kalziumkonzentration durch Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, wohingegen DAG die Proteinkinase C (PKC) stimuliert. Die PKC hat in den meisten sekretorischen Zellen eine stimulierende Wirkung auf Exocytosevorgänge. Eine direkte Stimulation der PKC in isolierten nativen JG-Zellen durch Phorbol ester zeigte jedoch eine Inhibierung der Reninsekretion (Kurtz et al. 1986, Ritthaler et al., 1996), wohingegen die basale Renin mRNA-Abundanz unbeeinflusst blieb (DellaBrina et al., 1995).

6. Physiologische Regulation der Reninfreisetzung und Reningenexpression

Die Reninfreisetzung kann entweder durch konstitutive Sekretion von Prorenin oder durch eine regulierte Exocytose des in sekretorische Speichervesikel verpackten Renins erfolgen. Während die konstitutive Proreninfreisetzung hauptsächlich von der ad hoc Syntheserate abhängig ist, wird die Exocytose des aktiven Renins durch eine Reihe von systemischen und intrarenalen Faktoren reguliert (Davis et al., 1976; Keeton et al., 1981; Wagner u. Kurtz, 1998).

Die renale Reninsekretion und Reningenexpression wird durch 4 physiologische Feedback-Mechanismen gesteuert:

- intrarenaler Blutdruck
- Kochsalzbilanz des Körpers
- sympathisches Nervensystem
- humorale und lokal synthetisierte Regulatoren: NO, Prostaglandine, Angiotensin II, Endotheline

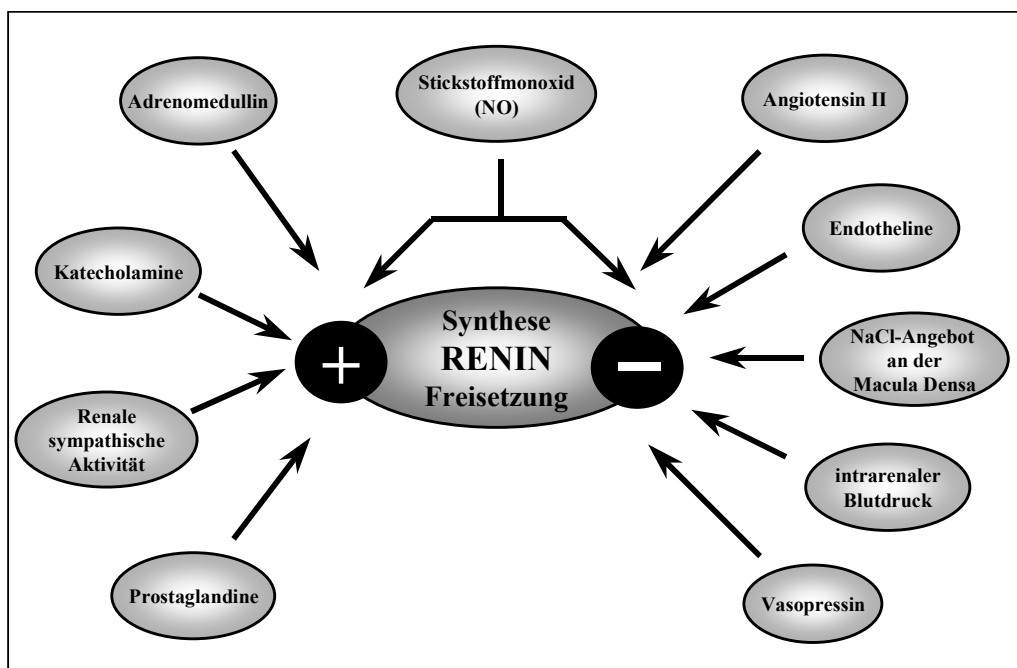


Abb.4: Physiologische Regulationsmechanismen der Reninfreisetzung und Reninsynthese

6.1 Intrarenaler Blutdruck

Experimente an der isoliert perfundierten Niere zeigten, dass eine Druckreduktion die Reninfreisetzung stimuliert, wohingegen eine Erhöhung des Perfusionsdrucks die Reninsekretion hemmt. Dieses Phänomen lässt auf die Existenz eines in der Niere lokalisierten Barorezeptors schließen, der eine Änderung des renalen Perfusionsdrucks registriert und mit einer Variation der Reninsekretion reagiert. Die genaue Lokalisation und Funktionsweise dieses Barorezeptors ist bis dato noch unbekannt, jedoch legen experimentelle Beobachtungen die Vermutung nahe, dass dieser Mechanorezeptor in den afferenten Arteriolen der Glomeruli lokalisiert ist und dort als eine Art Dehnungsrezeptor

agiert. Die JG-Zellen und die ihnen aufgelagerten Endothelzellen könnten hierbei als mechanische Druckrezeptoren wirken und Dehnungen der Gefäßwand detektieren. So konnte gezeigt werden, dass isolierte JG-Zellen, die auf einem elastischen Untergrund kultiviert wurden, bei zunehmender mechanischer Dehnung mit einer verminderten Reninfreisetzung antworten (Fray und Lush, 1984; Carey et al., 1997). Die hieran beteiligte Signaltransduktion ist noch nicht genau aufgeklärt, möglicherweise führt eine über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Hemmung der Reninsekretion.

Es gibt aber auch Hinweise, dass die Reninfreisetzung über die von Scherkräften aus dem Endothel freigesetzten vasoaktiven Substanzen, wie z.B. NO oder Endothelin, reguliert wird (Daniel und Ives, 1989; Yoshizawa et al., 1989).

Dieser negative Feedback-Mechanismus (Moffet et al., 1986) wirkt sowohl auf Ebene der Reninsekretion als auch Reninsynthese, d.h. ein Abfall des Nierenperfusionsdrucks stimuliert sowohl die Reninsekretion als auch die Reningenexpression.

6.2 Kochsalzbilanz des Körpers

Der Salzhaushalt des Körpers stellt eine wichtige Determinante des RAAS dar. So wird die Reninsekretion und Reningenexpression durch einen negativen Feedback-Mechanismus an die Kochsalzzufuhr des Organismus angepasst (Davis u. Freeman, 1976; Modena et al., 1993; Holmer et al., 1993)

Die Signaltransduktion dieses Feedback-Mechanismus ist noch weitgehend unbekannt. Es könnte sich jedoch um einen in der Macula Densa lokalisierten Signalweg handeln (macula densa signaling). Nachdem in der Macula Densa sowohl eine von der Kochsalz-Zufuhr abhängige Expression der neuronalen NO-Synthase (nNOS) (Mundel et al., 1992) als auch der Cyclooxygenase 2 (Harding et al., 1997) nachgewiesen werden konnte, wird über eine Beteiligung von NO und/oder der COX-2 abhängigen Prostaglandine (Schricker et al., 1995) am „macula densa signaling“ spekuliert.

6.3 Sympathisches Nervensystem

Die JG-Zellen werden durch das sympathische Nervensystem direkt innerviert, so dass eine Aktivierung β_1 -adrenerger Rezeptoren zu einer cAMP induzierten Stimulierung der Reninfreisetzung und Reningenexpression führt (Hackenthal et al., 1990).

Eine Denervierung der Niere (Zhang et al., 1992) sowie eine Behandlung mit β -Rezeptorantagonisten führt zu einer Suppression der Reninfreisetzung und Reningenexpression. Der β -Rezeptoragonist Isoprenalin hingegen bewirkt eine verstärkte Reninfreisetzung und Reningenexpression (Holmer et al., 1997).

6.4 Humorale und lokal synthetisierte Faktoren

Vasodilatorische Substanzen wie Bradykinin, Calcitonin gene related peptide, Dopamin, Adrenomedullin und Prostaglandine führen zu einer Stimulation der Reninfreisetzung und Reningenexpression (Keeton u. Campbell, 1981; Kurtz et al., 1988, 1988, 1989; Jensen et al., 1997). Vasokonstriktische Substanzen wie Arginin-Vasopressin (AVP), Angiotensin II und Adenosin bzw. Platelet-Activating Factor (PAF) hemmen hingegen die Reninfreisetzung und Reningenexpression (Keeton u. Capbell, 1981; Pfeilschifter et al., 1985; Kurtz et al., 1986, 1986, 1988).

Zusätzlich kann die Reninsekretion bzw. die Reningenexpression durch lokal synthetisierte Mediatoren wie z.B. NO, Prostaglandine und Endotheline reguliert werden:

Stickstoffmonoxid (NO)

In der Niere erfolgt die NO Bildung entweder durch eine in den endothelialen Zellen der afferenten Arteriolen exprimierten endothelialen NO-Synthase (e-NOS) (Bachmann et al., 1995), oder durch eine in den benachbarten Tubuluszellen der Macula Densa vorkommenden neuronalen NO-Synthase (n-NOS) (Mundel et al., 1992; Wilcox et al., 1992). Trotz widersprüchlicher Ergebnisse kann dem Regulator NO eine überwiegend stimulatorische Wirkung auf die Reninfreisetzung zugesprochen werden. So zeigten kürzlich an der isoliert perfundierten Niere erhobene Daten (Kurtz et al., 1998), dass NO die Reninsekretion mittels eines cGMP/cGMP-Kinase-Wegs inhibiert, aber gleichzeitig durch Hemmung des cAMP-Abbaus durch Blockade der Phosphodiesterase-3 (PDE-3) (Chiu et al., 1996) die Reninfreisetzung über den cAMP/cAMP-Kinase-Weg stimulieren kann.

Prostaglandine

Die Prostaglandine werden seit längerer Zeit als potentielle Regulatoren der Reninsekretion diskutiert (Vander et al., 1968). Die vasodilatierenden Prostaglandine PGI₂ (Prostazyklin) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) wirken stimulatorisch auf die Reningenexpression und Reninsekretion, während Lipooxygenase-Produkte (verschiedene Vorstufen der Leukotriene) inhibitorisch wirken (Antonipillai et al., 1987; Beierwaltes, 1990; Campbell u. Heinrich, 1990). Experimente mit Cyclooxygenase-2 Hemmern konnten den stimulatorischen Effekt von Prostaglandinen auf die Reningenexpression und Reninfreisetzung nachweisen (Gerber et al., 1981; Greenberg et al., 1993; Schricker et al., 1995). Die bereits bekannte Stimulation der Reninsynthese und Reninfreisetzung bei Kochsalzmangel konnte durch selektive COX-Blocker stark abgeschwächt werden (Harding et al., 1997; Traynor et al., 1998). Die Prostaglandine scheinen zusätzlich an der Stimulation des Reninsystems bei akuter Nierenhypoperfusion beteiligt zu sein (Berl et al., 1979; Blackshear et al., 1979; Data et al., 1978; Imagawa et al., 1985; Schricker et al., 1995).

7. Einfluss vasokonstriktorischer Hormone auf die Reninsekretion und Reningenexpression

7.1 Angiotensin II

Angiotensin II, der Effektor des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), vermittelt seine Wirkung über spezifische G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren, den AT₁- bzw. AT₂-Rezeptoren. Angiotensin II scheint nach heutigem Kenntnisstand vorwiegend, mit Ausnahme der Katecholaminfreisetzung aus dem Nebennierenmark, über den AT₁ Rezeptor zu wirken. Bei Maus und Ratte kommt dieser in den Subtypen AT_{1a} und AT_{1b} vor. Eine Bindung von Angiotensin II an den AT₁-Rezeptor kann zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) über das G-Protein G_q oder zu einer Hemmung der Adenylatzyklase mittels des G-Proteins G_i führen. Die Phospholipase C katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) und führt somit zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG und einen durch IP₃ induzierten Anstieg der cytoplasmatischen Kalziumkonzentration.

Zirkulierendes Angiotensin II hat zahlreiche Wirkungen. So steigert ANG II den Salzappetit und das Durstgefühl und führt in der Neurohypophyse zu einer erhöhten Ausschüttung des antidiuretischen Hormones ADH (Boujour et al., 1979). In der Nebennierenrinde steuert ANG II die Synthese und Freisetzung des Korticosteroids Aldosteron. Aldosteron bewirkt in der Niere eine verstärkte Rückresorption von Wasser und Kochsalz und führt dadurch zu einer Erhöhung des Extrazellulärvolumens. Die Angiotensin II Wirkungen in der Niere, vermittelt über AT1-Rezeptoren, sind u.a. eine gesteigerte tubuläre Natrium-Rückresorption, Kontraktion von glomerulären Mesangialzellen und Vasokonstriktion von afferenten und efferenten Arteriolen. Angiotensin II kann dadurch den renalen Plasmafluss sowie die glomeruläre Filtrationsrate und die Na^+ -Exkretion beeinflussen.

Angiotensin II beeinflusst somit in vivo eine Reihe von physiologischen Parametern, die selbst direkte Regulatoren des RAAS darstellen, wie z.B. den intrarenalen Blutdruck (Hackenthal et al., 1990), die Kochsalz-Homöostase (Hackenthal et al., 1990) sowie die Sympathikusaktivität (Holmer et al., 1993) und reguliert dadurch über einen indirekten negativen Feedbackmechanismus die Reninsekretion und Reningenexpression. Zusätzlich liegen auch Hinweise auf eine direkte zelluläre Regulation der Reninfreisetzung und Reningenexpression durch ANGII über einen sogenannten negativen „short loop“ Feedbackmechanismus vor. So konnte gezeigt werden, dass ANGII in isoliert perfundierten Nieren (Vandogen et al., 1974) und nativen JG-Zellen (Khayat et al., 1981, Pinet et al., 1987, Kurtz et al., 1991) eine Hemmung der Reninfreisetzung induziert. Eine direkte Gabe von ANGII führte sowohl zu einer Inhibierung der Reninsekretion als auch der Reningenexpression (Schunkert et al., 1992). Eine Blockade von ANGII-AT1 Rezeptoren (Ichihara et al., 1995) bzw. Untersuchungen mit ACE-Hemmern (Nakamura et al., 1985) zeigten hingegen eine Stimulierung der Reninsekretion und Reningenexpression. Andererseits widerlegten Untersuchungen an Angiotensin AT1-Rezeptor knockout-Mäusen (Matsusaka et al., 1996) eine direkte zelluläre Wirkung von ANGII über den AT1-Rezeptor. So wurde eine ANG II Wirkung durch Prostaglandine über eine Regulation der Cyclooxygenase-2 Expression postuliert (Cheng et al., 1999). Ausgehend von den vorliegenden Daten ist es bis heute unklar, ob ANGII direkt auf Ebene der JG-Zellen über einen negativen „short loop“ Feedbackmechanismus die Reningenexpression und Reninsekretion supprimiert.

7.2 Endotheline

Das im Überstand von kultivierten Endothelzellen entdeckte Peptid Endothelin (ca. 2.5 kDa, 21 AS) gilt bis dato als der am stärksten wirksame Vasokonstriktor (Yanagisawa et al., 1988). Bis heute sind im menschlichen Genom drei, sich hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz nur geringfügig unterscheidende Isoformen des Endothelins (ET-1, ET-2, ET-3) bekannt, von denen jedoch nur ET-1 und ET-3 in der Niere exprimiert werden (Firth u. Ratcliffe, 1992). Die Wirkung der Endotheline wird über bestimmte G-Protein gekoppelte Rezeptortypen, den sogenannten ET-Rezeptoren (ET_A und ET_B) vermittelt. Die Endotheline besitzen außer ihren vasokonstriktorisches Eigenschaften noch eine Reihe weiterer physiologischer Wirkungen. So zeigen sie mitogene Effekte bei verschiedenen Zelltypen wie z.B. glatten Muskelzellen, Mesangialzellen und Fibroblasten (Brown and Littlewood, 1989; Hahn et al., 1990; Simonson et al., 1992). Am Herzen bewirken sie wahrscheinlich positiv inotrope Effekte (Krämer et al., 1992), wohingegen ihnen in der Lunge bronchokonstriktorisches Wirkungen (Uchida et al., 1988) zugeschrieben werden.

Auch in der Niere vermitteln die Endotheline eine Reihe von Effekten und Funktionen. So erhöhen sie den renalen Gefäßwiderstand in afferenten und efferenten Arteriolen und beeinflussen die glomeruläre Filtrationsrate sowie die renale Durchblutung und die Mesangialfunktion. Die Endotheline besitzen auch natriuretische Wirkungen, so dass die glomeruläre Filtrationsrate und der renale Blutfluss vermindert werden (Kohan, 1993). Die natriuretischen Effekte der Endotheline werden zum einen durch eine direkte Hemmung des Natriumtransports im Nephron und zum anderen durch eine Stimulierung der ANP-Freisetzung erklärt (Kon und Badr, 1991).

Über den Einfluss der Endotheline auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System liegen bislang widersprüchliche Ergebnisse vor. Durch Versuche an der isoliert perfundierten Niere wurde ein dualer Effekt der Endotheline aufgezeigt. So führte eine picomolare Dosis zu einer Stimulierung der Reninfreisetzung, wohingegen höhere Dosierungen eine Inhibierung der Reninsekretion bewirkten (Scholz et al., 1995). Diese Ergebnisse stimmen mit einer Reihe von in vitro Daten überein. So wurde an isolierten Glomeruli (Rakugi et al., 1988) und isolierten JG-Zellen (Takagi et al., 1989; Moe et al., 1991) eine durch Endotheline induzierte Suppression der Reninsekretion festgestellt. Ritthaler et al. konnten zusätzlich zeigen, dass Endotheline die cAMP gesteuerte Stimulation der Reningenexpression und Reninsekretion signifikant supprimierten, wohingegen die basale

Reningenexpression und Reninsynthese unbeeinflusst blieb (Ritthaler et al., 1995; 1996). Andererseits bewirkten Endotheline in humanen Decidua Zellen (Chao et al., 1993) und Chorion Zellen (Caroff et al., 1993) eine Stimulation der Reningenexpression und Reninsynthese.

8. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen potentiellen direkten zellulären Effekt von vasokonstriktorisch wirkenden Hormonen am Beispiel von Angiotensin II und Endothelin 3 auf die Reningenexpression am Modellsystem der juxtaglomerulären Zelllinie As4.1 zu untersuchen. Zusätzlich sollte durch eine nähere Charakterisierung der beteiligten Signaltransduktionswege und Wirkungsweisen der Hormone ein möglicherweise gemeinsam genutzter Signalweg identifiziert und aufgeklärt werden.

II. Material und Methoden

1. Geräte

Analysenwaage	Mettler, H-20 T
Autoklav	KSG 112
Elektrophoreseapparatur	Life Technologies Inc., Mod. S2
	Pharmacia, LKB 2050 MIDGET
Geltrockner	BIO-RAD, Model 583 gel-dryer
	Vacuum Slab gel-dryer
Heißluftschüttler	New Brunswick Scientific, Innova 4000
Inkubationsschrank	Heraeus, Modell B 6200
	IG 150 Jouan, 37 °C, 5 %ige CO ₂ -Atmosphäre
Instant Imager	Packard, Electronic Autoradiographie
Kühl- und Gefrierschränke	AEG, Santo Kühlschrank
	Siemens, Comfort plus Gefrierschrank
	New Brunswick Scientific, Ultra-low-freezer -85°C
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001
Mikroskop	Zeiss, IG 03
Ölpumpe	Edwards, High Vacuum Pump Typ B5/2208
PCR Geräte	MWG, Mod. Omnigene Thermocycler
	Perkin Elmer, DNA Thermo Cycler 480
pH-Meter	Knick, Digital pH-Meter
Pipetten	Gilson, Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000
Spannungsquellen	Pharmacia, LKB ECPS 3000/150
	Pharmacia, LKB GPS 200/400
	Pharmacia, Multidrive XL
	BIO-RAD, Power-Pac 3000
Sterilbank	Jouan, IC 2.12
Szintillationszähler	Packard, Tri-Carb 1500
UV-Spektrometer	Pharmacia, Gene Quant II
UV-Leuchttisch	Renner, Fluorescent Tables
Vakuumzentrifuge	Uniequix, Univapo 150H
Vortexgerät	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Waage	Mettler, P-1210 Feinwaage
Wärmeblock	Eppendorf, Thermostat 5320
	Eppendorf, Thermomixer 5436
Wasserbad	Haake, Modell W13
Zentrifugen	Eppendorf, Centrifuge 5414, 5415, 5414C
	Heraeus, Biofuge 28 RS
	Sepatech, Megafuge 1,0
	Sorvall, Superspeed RC2-B
	Sigma, 2 K 15 Kühlzentrifuge

2. Materialien

2.1 Verbrauchsmaterialien

5ml, 10ml, 25ml Auslaufpipetten (Sarstedt)
Chromatographiepapier (Whatman® 3mm CHR)
Deckgläser
Glaswaren (Schott)
Latex-Handschuhe (Roth, Romed, Hartmann)
Objektträger

Petrischalen (steril)
Pipettenspitzen (Sarstedt, Biozym)
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen
0,5ml, 1,5ml, 2,0ml Reagiergefäße (Sarstedt)
Röntgenfilme (Kodak, Biomax MR; Konika, X-Ray Film medical)
15ml, 50ml Schraubgefäße (Sarstedt)
Skalpellklingen (steril)
Szintillationsgläser (Packard)
Wasserbad (DC 1, Haake)
Zellkulturflaschen (25 cm² u. 75 cm², canted neck; Sarstedt)

2.2 Chemikalien

Acrylamid (USB)
Agarose (Biozym)
Ammoniumpersulfat (Sigma)
Borsäure (Merck)
Bromphenolblau (Sigma)
Chloroform (Merck)
Diethylpyrocarbonat DEPC (Fluka)
Dithiothreitol DTT (GIBCO)
Essigsäure (Merck)
Ethanol p.a. (Merck)
Ethidiumbromid (Sigma)
Ethyldiamintetraessigsäure EDTA (Sigma)
Formamid (Fluka)
Glycerin 87% (Merck)
Guanidinium-thiocyanat (Fluka)
Harnstoff (Merck)
8-Hydroxychinolin (Sigma)
Isopropanol (Merck)
Kollagenase A (Boehringer)
β-Mercaptoethanol (Merck)
Methanol (Merck)
Natriumacetat (Merck)
Natriumchlorid (Merck)
Natriumcitrat (Merck)
Natriumdodecylsulfat SDS (Serva)
Natriumhydroxid (Merck)
Phenol (Merck)
Photochemikalien (Entwickler G230, Fixierer G305, Agfa)
Piperazine-N,N'-bis[2-ethane-sulfonic acid] PIPES (Sigma)
Repell Silane (Pharmacia)
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz (Fluka)
Szintillationsflüssigkeit (Roth, Rotiszint-22[®])
Tetramethylethyldiamid TEMED (Sigma)
Tris (Fluka)
Tris-aminomethan (Sigma)
Tris-ammoniummethan (Merck)

2.3 Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase, 200 u/ µl (Gibco)
Taq Polymerase, 5.000 u/ ml (Boehringer)
*Bam*H1, 18.000 u/ ml (Pharmacia)
 DNase I, 7.500 u/ ml (Pharmacia)
*Eco*R1, 20.000 u/ ml (Pharmacia)
*Hind*III, 18.000 u/ ml (Pharmacia)
*Sma*I, 18.000 u/ml (Pharmacia)
*Bgl*II 12.000 u/ml (Pharmacia)
 T4-Ligase, 6.000 u/ ml (Pharmacia)
 SP6-Polymerase, 80.000 u/ ml (Promega)

2.4 Vektoren

pGL3-control (Promega)
 pGL3-enhancer (Promega)
 pRL-TK (Promega)
 pRL-SV40 (promega)
 pCRII[®]-TOPO
 pCR-XL[®]-TOPO

2.5 Filme und Photochemikalien

Entwickler G230 (Agfa)
 Fixierer G305 (Agfa)
 Filme Konica x-ray versch. Größen
 Kodak MS Film versch. Größen

2.6 Lösungen und Puffer

2.6.1 Isolierung von Total-RNA

Lösung D	250 g Guanidinium Thiocyanat 4M 293 ml H ₂ O 125 ml 0,1 M NaCitrat 26,4 ml 10 % Sarcosyl vor Gebrauch: 360 µl 2-Mercapto-ethanol/ 50 ml Lösung D zugeben
Wassergesättigtes Phenol	1 kg Phenol bei ca. 60 °C schmelzen + 1 Vol. DEPC-Wasser + 0,1 % Hydroxychinolin aufgießen, schütteln, Phasen trennen lassen
2 M Natriumacetat pH4	41,02 g Natriumacetat 120 ml Eisessig (pH 4 einstellen) ad 250 ml mit DEPC-Wasser
Chloroform	Chloroform p.a.
Isopropanol	Isopropanol 100 % p.a

	.
Ethanol	Ethanol 96 % p.a.
0,1 M Natriumcitrat pH 7	7,35 g Natriumcitrat pH 7 mit 1 M HCl einstellen (ca. 0,9 ml) ad 250 ml mit DEPC-Wasser

2.6.2 RT / PCR und Klonierung

10x PCR Puffer (Boehringer)	100 mM Tris/ HCl (pH 8,3) 100 mM KCl 15 mM MgCl ₂
10x Ligationspuffer	200 mM Tris/ HCl (pH 7,6) 50 mM MgCl ₂ 50 mM DTT 50 µg/ ml BSA 1 mM ATP

10x One for all Buffer (Promega)	100 mM Tris-Acetat 100 mM Mg-Acetat 500 mM K-Acetat
5x RT Puffer (Gibco)	0,25 mM Tris/HCl (pH8,3) 0,375 M KCl 50 mM DTT 15 mM MgCl ₂
10x Kinase Puffer	0,5 M Tris/ HCl (pH 7,6) 0,1 M MgCl ₂ 50 mM DTT 1 mM EDTA (pH 8)
10x TBE Puffer	0,9 M Tris Base 0,9 M Borsäure 0,02 M EDTA
Auftragspuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 50 % Glycerol ad 100 ml mit H ₂ O
DNA Molekulargewichtsstandard	λDNA/ Pvu II Fragmente (Promega) φX 174 RF DNA/ Hae III Fragmente (Gibco) pBR 322/ Hpa II (Promega)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid 50 mg/ ml in H ₂ O

2.6.3 Medien und Agarplatten

Dulbecco's modified Eagle Medium 500 ml (DMEM); Biochrom	5 ml Antibiotic and Antimycotic Solution: 1000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin, 25 µg Amphotericin pro ml in 0,9 % NaCl 50 ml Fetales Kälberserum (Seromed) Na-Pyruvat L-Glutamin
LB-Medium (Luria-Bertani)	1 % Bactotrypton (Difco) 0,5 % Bactoyeast (Difco) 1 % NaCl in H ₂ O _{bide} ; autoklavieren
LB-Agarplatten	1 % Bactotrypton (Difco) 0,5 % Bactoyeast (Difco) 1 % NaCl 3 % Bactoagar (Difco) + Ampicillin (80 mg/ ml) in Petrischalen mit Deckel (Falcon) gießen
LB-Agarplatten (blau/weiß)	1 % Bactotrypton (Difco) 0,5 % Bactoyeast (Difco) 1 % NaCl 3 % Bactoagar (Difco) + Ampicillin (80 mg/ ml) + 0,08 % 100 mM IPTG (Gerbu) + 0,2 % X-Gal 2 % in DMF (Sigma) in Petrischalen mit Deckel (Falcon) gießen

2.6.4 In vitro Transkription

5x Transkriptionspuffer	
TE-Puffer	2 M Tris/ HCl (pH 7,5) 0,5 M EDTA (pH 8)
TE-Puffer/ 0,1 % SDS (TES)	TE-Puffer + 0,1 % SDS

2.6.5 RNase-Protection-Assay

Hybridisierungspuffer (pH 6,4)	40 mM PIPES 400 mM NaCl 80 % Formamide 500 mM EDTA ad 40 ml mit DEPC-Wasser
RNase Puffer	10 mM Tris (pH 7,5) 5 mM EDTA 300 mM NaCl
RNase-Stammlösung	4 mg/ ml RNase A (Boehringer) 200 µg/ ml RNase T1 (Boehringer) in RNase Puffer
Proteinase K/ SDS Lösung	1 mg ml Proteinase K in RNase Puffer vor Gebrauch: + 200 µl 20 % SDS in H ₂ O _{bide} .

Phenol/ Chloroform Lösung	AquaPhenol (Appligene) mit 1 M Tris/ HCl (pH 8) + 100 % Chloroform + 0,1 % Hydroxychinolin
DEPC-Wasser	1/ 1000 Vol. Diethylpyrocarbonat (Fluka) in H ₂ O _{bidest.} ; autoklavieren
Auftragspuffer für Acrylamidgele	0,1 % Bromphenolblau (Merck) 0,1 % XylenCyanol (Merck) 80 % Formamid in 1x TBE Puffer
TEMED®	
10 % APS	10 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O
8 % Acrylamidgel	Rotiphorese® Sequenziergelsystem (Roth) für 1l: 320 ml Konzentrat 580 ml Verdünner 100 ml Puffer

2.7 Kits

Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)
 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen)
 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
 Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
 TOPO®XL PCR Cloning Kit (Invitrogen)
 TOPO®TA Cloning Kit (Invitrogen)
 Protein Kinase Assay Kit „non-radioactive“ (Calbiochem)
 Quikchange™ site-directed mutagenesis Kit (Stratagene)

3. Zellkultur

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine aus transgenen Mäusen isolierte juxtaglomeruläre Nierentumorzelllinie (AS4.1) verwendet. Die Etablierung der Zelllinie erfolgte durch transgene Tumorgenese mittels eines, unter der Kontrolle des Ren2-Reninpromotor stehenden T40-Antigens (Sigmund et al. 1990). Die Zellen wurden als DMSO-Kultur von der American Type Culture Collection (ATCC No. CRL 2193) bezogen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom) unter Zusatz von 10 % FCS, L-Glutamin, Na-pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C in 10 % CO₂-Atmosphäre. Während der Kultur wurde das Kulturmedium in einem Intervall von 48 Stunden gewechselt. Zur Durchführung der Versuche erfolgte eine Subkultivierung der Zellen in 25 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt). Nachdem die Zellen ein ca. 80 %iges Konfluenzstadium erreicht hatten, wurde das Medium unter Zusatz der jeweiligen Testsubstanzen ersetzt, und

nach Ablauf der Inkubationsperiode erfolgte die zur Durchführung der jeweiligen Versuche nötige Isolationsprozedur.

4. Isolierung von Total RNA

4.1 Schutzmaßnahmen

Um eine Degradation der RNA beim Isolationsvorgang zu vermeiden, wurden folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen:

Alle verwendeten Glas- und Metallgeräte wurden vor ihrer Benutzung bei 180°C für 2 h im Hitzeschrank inkubiert. Durch diese Hitzebehandlung konnte sichergestellt werden, dass eventuell vorhandene, gegenüber herkömmlichen Autoklavieren unempfindliche RNasen zerstört wurden. Alle bei der Isolation benötigten Puffer und Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)- behandeltem bidest.Wasser angesetzt. Das DEPC wurde in 0,1 % iger Konzentration zugesetzt und nach 12 h Inkubationszeit durch Autoklavieren bei 121°C, 2 bar für 20 min zerstört. Alle Arbeitsvorgänge (Zugabe von Lösungen, Inkubation, Zentrifugation usw.) wurden, soweit möglich, auf Eis bzw. in Kühlzentrifugen (4°C) durchgeführt, um noch möglicherweise vorhandene RNase-Aktivitäten zu minimieren.

4.2 Durchführung der RNA-Isolierung

Bei der durchgeführten RNA-Isolationsprozedur handelte es sich im wesentlichen um eine modifizierte Methode nach Chomzynski und Sacchi (Chomzynski und Sacchi, 1987).

Zu Beginn der Isolation musste das Kulturmedium vollständig aus den Zellkulturflaschen entfernt werden. Anschließend wurde der Zellrasen mit Lösung D (800µl für 75cm²-Flasche bzw. 500 µl für 25 cm²-Flaschen), für 5 min inkubiert, durch mechanisches Abkratzen mittels eines Zellschabers (cell-scraper; Sarstadt) vom Flaschenboden isoliert und in ein 2.0 ml Eppendorf-Cup überführt. Nach 20 sec Vortexen fügte man der Reihe nach folgende Reagenzien zu, wobei nach jeder Zugabe für ca. 20 sec gevortext wurde:

1/10 Vol. Natriumacetat (pH 4,0)
1 Vol. wassergesättigtes Phenol (0,2% Hydroxychinolin)
2/10 Vol. Chloroform

Anschließend wurde das so erhaltene, milchig-trübe Gemisch 15 min auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung zentrifugierte man das Gemisch für 30 min bei 13500 rpm und 4°C in

einer Sorvall-Zentrifuge. Die obere, wässrige Phase, in der die RNA gelöst war, wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 2.0 ml Eppendorf-Cup überführt, mit 1 Vol. Isopropanol versetzt und für mindestens 1 h bei -20°C gefällt und anschließend durch 30 minütiges Zentrifugieren (13500 rpm, 4°C) pelletiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 500 μl 70%igem Ethanol. Das Pellet wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 100 μl DEPC-Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

Lösung D:

4 M	Guanidinium-thiocyanat
25 mM	Na-Citrat; pH 7.0
0.5 %	Sarcosyl
100 mM	β -Mercaptoethanol
10 mM	EDTA

4.3 Bestimmung der Ausbeute

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm in einem UV-Spektrometer ermittelt.

Hierzu wurde die RNA 1:20 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Die Extinktion einer RNA-Lösung mit einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ ergibt bei einer Wellenlänge von 260 nm den Wert 1.0.

Die Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration ist bei dieser Messung linear. Aus dem Extinktionswert und dem Verdünnungsfaktor der vermessenen Lösung ließ sich die Konzentration der isolierten RNA bestimmen.

Bei Konzentrationsbestimmungen von DNA-Lösungen wurde analog verfahren. Jedoch entspricht hier ein Extinktionswert von 1.0 bei 260 nm Wellenlänge einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$.

4.4 Reinheit und Qualität der isolierten RNA

A: Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm (ratio $E_{260\text{ nm}} / E_{280\text{ nm}}$) kann auf den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäure-Lösung geschlossen werden.

Im Idealfall einer reinen Nukleinsäure-Lösung erhält man einen Wert von 2.0. Da Proteine und im besonderen ihre aromatischen Aminosäurebestandteile, wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin mit ihren aromatischen Ringsystemen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, sinkt der Quotient bei einer etwaigen Verunreinigung der Lösung mit vorhandenen Proteinen. Für die vorliegenden Versuche wurden ausschließlich RNA-Präparationen mit einer ratio $E_{260\text{ nm}}/E_{280\text{ nm}}$ von 1.5 bis 2.0 verwendet.

B: Qualitätskontrolle anhand einer Gelelektrophorese

Hierzu wurde 1 µg isolierte Total-RNA mit DEPC-Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt, mit 2 µl RNase-freiem Ladebuffer versetzt, 5 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf einem 1,0 - 1,5 %igem Agarosegel (+ 2 µl Ethidiumbromid [50 mg/ml]) bei einer Spannung von 100 Volt aufgetrennt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Gelkammer vor dem Gellauf gereinigt, und nur frischer TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet wurde, um eine RNA-Degradation durch RNase-Kontamination während des Gellaufs zu verhindern. Als Qualitätskriterium für intakte RNA diente das klare Auftreten von 2 ribosomalen RNA-Banden (18S, 28S).

Alle isolierten und für die vorliegende Arbeit verwendeten RNA-Proben wurden dieser Qualitätsprüfung unterzogen. Folgende Abbildung 4 zeigt RNA-Proben von verschiedenen As4.1 RNA-Präparationen.

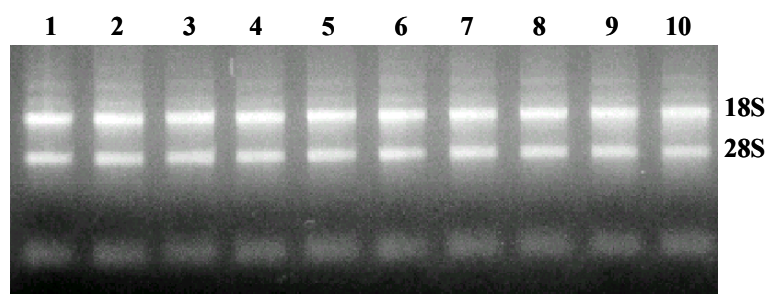


Abb.4: RNA-Präparation von As4.1-Zellen
(Agarosegel 1%; Spur 1-10 jeweils 1µg Total-RNA)

5. Quantifizierung der mRNA mittels des RNase Protection Assays

Prinzip:

Bei der Durchführung des RNase Protection Assays wird eine, zur mRNA des entsprechenden Gens komplementäre, radioaktiv markierte RNA (cRNA-Sonde) verwendet, die mit sehr hoher Spezifität mit der jeweiligen, zu quantifizierenden mRNA hybridisiert. Die so erhaltenen doppelsträngigen, stabilen Hybride sind im Gegensatz zu unhybridisierter, einzelsträngiger mRNA gegenüber einem RNase-Verdau geschützt und werden mittels Gelchromatographie aufgetrennt. Eine Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität.

Vorgehen:

Sondenherstellung

Zunächst wurde eine mRNA Population (1µg Total-RNA) durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben (RT-Reaktion). Aus diesem cDNA Pool wurde mit spezifischen Oligonukleotiden (Primern) die cDNA des gewünschten Genes mit der Polymerase Kettenreaktion („Polymerase chain reaction“-PCR) amplifiziert.

Klonierung

Nach Aufreinigung der amplifizierten Fragmente wurden diese in einen Klonierungsvektor kloniert und zur Überprüfung der Basenfolge sequenziert.

Protection Assay

Durch eine „in vitro Transkription“ mit $\alpha^{32}\text{P}$ Guanosintriphosphat ($[\alpha^{32}\text{P}]\text{-GTP}$) wurde eine, zu der zu quantifizierenden mRNA komplementäre, radioaktiv markierte Hybridisierungssonde (cRNA-Sonde) hergestellt. Die cRNA-Sonde wurde zur Total-RNA gegeben und mit der zu untersuchenden mRNA hybridisiert. Die so erhaltenen Hybride wurden nach einem Aufreinigungsschritt gelchromatographisch aufgetrennt und die inkorporierte Radioaktivität gemessen.

5.1 Durchführung des RNase Protection Assays

5.1.1 Verwendete Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide zur Herstellung von $\alpha^{32}\text{P}$ -markierten Aktin- bzw. Renin-Sonden wurden bereits im Rahmen früherer Arbeiten von Frau Dr. Wagner am Lehrstuhl für Physiologie I, Prof. Dr. Kurtz -Universität Regensburg- hergestellt und zur Durchführung dieser Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. An dieser Stelle soll nur eine kurze Aufstellung der verwendeten Plasmide erfolgen.

Gen	5'-Primer	3'-Primer	Klonierungs-vektor	Fragment-länge	Linearisierung
<i>β-Aktin</i> Alonso et al. <i>J.Mol.Evolut.</i> ;1986	5'ACCAACAG GGACGACATG 3'	5'ATGCTCACC CTCACGCCG3'	pSP73	293 bp	<i>HindIII</i>
<i>Maus Renin</i> Kim et al. <i>Nucl.Acids.Res</i> ;1989	5'ATGAAGGG GGTGTCTGTG GGGTC 3'	5'ATGTCGGGG AGGGTGGGCA CCTG 3'	pSP73	194 bp	<i>HindIII</i>

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Plasmide zur Sondenherstellung

5.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Maxi-Prep)

Zur Isolierung der im Protection Assay benötigten Plasmide in hoher Reinheit und Menge wurde ein Plasmid Isolationskit der Fa. Qiagen[®] verwendet, der bereits alle zur Isolation benötigten Lösungen und Puffer enthielt. Es konnte je nach Menge des Kulturmediums und der jeweiligen Plasmideigenschaften eine Ausbeute von ca. 400 μg Plasmid-DNA mit einer ratio E_{260}/E_{280} von ca.1.7 erzielt werden.

Durchführung:

Zunächst wurde am Vorabend eine 200 ml ÜN Kultur (LB-Medium: 1% Bactotrypton, 0.5% Bactoyeast, 1% NaCl in H_2O bidest.; autoklaviert) mit der Glycerinkultur des jeweilig zu isolierenden Plasmids angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler vermehrt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien bei 4000 rpm 15min pelletiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Bakterienpellet in 10 ml Lösung P1 resuspendiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurden 10 ml Lösung P2 gegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei

RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml eiskalter Lösung P3 wurde wieder vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation im SS34 Rotor bei 13000 rpm für 30 min. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, wobei möglicherweise noch vorhandene Schwebeteilchen entweder durch erneute Zentrifugation oder durch Filtration mittels eines Trichters mit eingelegtem Filter abgetrennt wurden. Schließlich trug man den jetzt klaren Überstand auf eine zuvor mit Lösung QBT voräquilibrierte 500-Qiagen-Maxiprepsäule auf und spülte nach dem Durchlauf mit 2 x 30 ml Lösung QC. Nach dem Waschen der Säule erfolgte das Eluieren der an der Säule gebundenen Plasmid-DNA mit 15 ml Lösung QF und anschließender Fällung der DNA mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut pelletiert, getrocknet und in 200 µl bidest. Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der Reinheit und Ausbeute der isolierten Plasmid-DNA erfolgte photometrisch. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

5.1.3 Linearisierung der Plasmide

Für die „in vitro Transkription“ wurde die in einer Maxiprep isolierte Plasmid-DNA durch ein Restriktionsenzym, dessen Restriktionsschnittstelle sich in 3'-Richtung nach dem klonierten Insert im Polylinkerbereich des entsprechenden Vektors befinden muss (beispielsweise *Hind* III) linearisiert.

SP6-binding site.....*Eco*R1 < 3' - [Insert ca. 100 - 500 bp] - 5' > *Bam*H1.....*Hind*III

Reaktionsansatz für die Plasmidlinearisierung:

Plasmid:	50 µg (~ 50 µl)
Restriktionsenzym:	250 units (hier <i>Hind</i> III)
10x opha Puffer:	20 µl
H ₂ O _{bidest.} :	ad 200 µl
für 2h bei 37°C	nach 1h weitere Zugabe von 20 units Restriktionsenzym

Nach einer Phenol/Chloroform Extraktion wurde das Ergebnis bzw. die Vollständigkeit der Linearisierung gelelektrophoretisch kontrolliert. Die Plasmidkonzentration wurde anhand photometrischer Messung der optischen Dichte ermittelt.

5.1.4 Herstellung einer radioaktiven cRNA Sonde

Durch die SP6-Polymerase erfolgte unter kontinuierlichem Einbau von [$\alpha^{32}\text{P}$] GTP die Synthese einer radioaktiv markierten cRNA Sonde. Der Reaktionsansatz wurde gemäß dem Protokoll von „Amersham Riboprobe System[®]“ (Amersham, Braunschweig) angesetzt:

pro Probe: (Ansatz erfolgte auf Eis)

NTP-Mix (ATP, UTP, CTP jeweils 6,66 mM)	0,9 μl
5x Transkriptionspuffer	1,2 μl
DTT (200mM)	0,6 μl
vortexen und zentrifugieren	
von obigem Mix	3,25 μl
RNasin (RNase-Inhibitor; Promega 20 units/ μl)	0,8 μl
Template (linearisierte Plasmid-DNA: Konz. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1,0 μl
SP6 Polymerase (80 units/ μl)	1,0 μl
[$\alpha^{32}\text{P}$] GTP	4,0 μl (~ 40 μCi)

Nach Zugabe aller Lösungen wurde kurz gevortext, zentrifugiert und für 60-90 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert. Der anschließende enzymatische Abbau, der noch im Reaktionsansatz vorhandenen, überschüssigen Plasmid-DNA, erfolgte durch Zugabe von 2 μl RNase-freier DNase I (1 unit) bei 40 °C im Wasserbad für 30 min. Die Abtrennung von nicht eingebauten radioaktiven Nucleotiden erfolgte über zuvor mit TES-Puffer (TE + 0,1% SDS) voräquilibrierten (3 x 3 min, 1000 rpm mit 200 μl Puffer) Sephadex G50 Säulen. Im Anschluss an den DNase-Verdau wurde der Transkriptionssansatz mit 87 μl TES-Puffer versetzt, auf die vorbereitete Säule aufgebracht und ebenfalls 3 min bei 1000 rpm in ein Schraubdeckelcup zentrifugiert. Das Eluat, das die von Nukleotidresten gereinigte cRNA Sonde enthält, wurde in 220 μl Ethanol mit 2 μl tRNA (10 mg/ ml DEPC-H₂O) und 10 μl Natriumacetat (3 M/ pH 4,8) bei -20 °C für 1 h ausgefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 rpm, 4 °C) wurde das Sondenpellet in 100 μl Hybridisierungspuffer aufgenommen und 15 min bei 95 °C denaturiert.

Zur Bestimmung der inkorporierten Radioaktivität wurden 2 μl der cRNA Sonde mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint[®]22) versetzt und im β -Counter gezählt. Die Aufbewahrung der cRNA Sonde erfolgte bei -20 °C.

5.1.5 Hybridisierung der RNA-Proben mit der cRNA-Sonde

Die jeweils zu vermessenden RNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut, die entsprechenden Mengen (10 µg für Renin bzw. 1 µg für Aktin) entnommen und in einer Vakuumzentrifuge einrotiert. Das so erhaltene RNA Pellet wurde mit 50 µl Hybridisierungspuffer und 500000 cpm der radioaktiv markierten Sonde versetzt und zunächst 15 min bei 95 °C auf dem Heizblock und anschließend über Nacht (mind. 6 h) bei 60 °C im Wasserbad inkubiert.

Parallel zu den Versuchsproben wurde 10 µg tRNA mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, um für die Auswertung des RNase Protection Assay einen Nullwert zu definieren und um zusätzlich eine Kontrolle der Sondenspezifität zu erhalten.

5.1.6 Durchführung des RNase Protection Assays

Nach der ÜN-Hybridisierung erfolgte durch Zugabe von RNase A und T1 der RNase Verdau von ungeschützter, nicht hybridisierter, einzelsträngiger RNA für 30 min bei RT. Im Anschluss wurden alle Proteine durch Proteinase K (37°C, 20min) abgebaut und der komplette Ansatz durch eine Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt.

Aus dem wässrigen Überstand wurde die doppelsträngige, hybridisierte RNA mit Ethanol und tRNA für mind. 1h bei -20°C ausgefällt (430µl Überstand + 900 µl Ethanol + 2 µl tRNA 10 mg/ml). Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (4°C , 30 min, 15000 rpm) und nach Absaugen des Überstands in 5 µl Auftragepuffer (AC-Puffer) aufgenommen, für 15 min bei 95°C denaturiert und auf einem 8%igen Acrylamidgel mit 1x TBE als Laufpuffer vertikal aufgetrennt.

5.1.7 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Gelelektrophorese. Das denaturierende 8%ige Acrylamidgel wurde, um eine optimale Polymerisation zu gewährleisten, mindestens 2 h vor Benutzung unter Verwendung eines Acrylamid-Gelmixes (Rotiphorese[®], DNA Sequenziersystem) hergestellt. Die Polymerisation des Acrylamids wurde durch Zugabe von 10 %igem Ammoniumpersulfat (APS) und Temed (Sigma) gestartet (560-650µl APS und 80-100µl Temed/80 ml Gellösung) und zwischen zwei, mit Silan vorbehandelte Glasplatten gegossen (Geldicke: 0,5mm). Während einer Vorlauf- bzw. Anwärmphase von 30-40 min bei 40W bzw. 80W (kleines Gel bzw. großes Gel, Laufpuffer 1xTBE) wurden

die Probenaufrägetaschen mehrmals mit Laufpuffer gespült, um Gelreste und kristallinen Harnstoff zu entfernen. Die Auftrennung der aufgetragenen Proben erfolgte für ca. 120 min bei 40 bzw. 80W (je nach Gelgröße). Anschließend wurde das Gel aus der Laufapparatur genommen, die Deckplatte entfernt, das Gel nach der ersten Laufmittelfront des AC-Puffers abgetrennt und mit einem Gemisch aus 10 % Eisessig, 10 % Methanol und 80 % Wasser 15-20 min fixiert. Nach der Überführung des Gels auf ein Whatman-Papier erfolgte die Trocknung für ca. 2 h im Vakuum.

5.1.8 Entwicklung der Röntgenfilme und Auswertung der Signale

Der Röntgenfilm wurde je nach Signalstärke der Hybridisierungsbanden für 1-2 Tage bei -70°C exponiert. Nach der Entwicklung des Films (Entwickler-, Unterbrecher- und Fixierlösung wurden jeweils nach Herstellervorschrift (Agfa) hergestellt) wurden die Hybridisierungsbanden sichtbar und die erhaltenen Signale konnten dann eindeutig den jeweiligen RNA-Proben zugeordnet werden. Die Messung der inkorporierten Radioaktivität der einzelnen Hybridisierungsbanden erfolgte in einem Instant Imager (Instant Imager 2024, Hewlett Packard, Electronic Autoradiographie) unter Nutzung der Auswertungssoftware. Zur Auswertung der Signale wurden die erhaltenen counts per minute (cpm) unter Einbezug der Halbwertszeit des radioaktiven Nukleotids und des durch die tRNA ermittelten Nullwerts korrigiert.

6. Bestimmung der Reninaktivität

Zur Bestimmung der Reninaktivität wurden die Zellen 16 Stunden vor Versuchsbeginn in 96 Multiwell Platten mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen /well subkultiviert. Zu Beginn der Versuche wurde das Kulturmedium unter Zusatz der jeweiligen Testsubstanzen ersetzt und für 16 Stunden auf den Zellen belassen. Zum Ende der Inkubationsperiode wurde das Kulturmedium in Eppendorf-Cups überführt, die Zellen durch Zugabe von 100 μl PBS+0.1 % Triton X-100 (30 min) lysiert und anschließend in Eppendorf-Cups überführt.

Sowohl der Überstand (Kulturmedium) als auch das Zelllysate konnten bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Um die Gesamtreninaktivität zu bestimmen, musste das inaktive Prorenin durch Trypsin-Behandlung (0.3 mg/ml für das Zelllysate bzw. 0.5 mg/ml für den Überstand, 1h bei RT) in das enzymatisch aktive Renin umgewandelt werden. Nach Hemmung der Trypsinaktivität

durch Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde dem Ansatz Angiotensinogen (Plasma von beidseitig nephrektomierten Ratten) im Überschuss zugesetzt. Das entsprechend der vorhandenen Reninaktivität entstandene Angiotensin I wurde durch einen Radioimmunoassay (DiaSorin, Biomedica) bestimmt.

7. Bestimmung der Proteinkinase C- Aktivität

Zur Bestimmung der Proteinkinase C-Aktivität nach Stimulation durch Phorbol ester, Endothelin 3 und Angiotensin II wurde ein „non-radioactive“ Protein Kinase Assay Kit der Fa. Calbiochem verwendet.

Probenaufbereitung:

Zu Beginn der Versuche wurden die Zellen in 25 cm² Flaschen mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen/Flasche ausgebracht und für 16 h unter Kontrollbedingungen gehalten. Anschließend wurden die Zellen für 16 h mit den Testsubstanzen (100 nmol/l PMA, 100 nmol/l Endothelin 3, 1 μ mol/l Angiotensin II und 1 μ mol/l Bisindolylmaleimide I) inkubiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml kaltem Sample Preparation Buffer aufgenommen, Ultraschall-behandelt und für 60 min bei 100.000 g und 4°C zentrifugiert. 12 μ l des so erhaltenen Überstands wurden anschließend für die weitere Messung eingesetzt.

Durchführung des Assay:

Die Durchführung des Assays erfolgte laut Pipettierschema des Herstellers. Nach Ende der ELISA Reaktion wurden die Proben in einem ELISA-Reader bei 492 nm vermessen.

8. Klonierung der Reninpromotorfragmente

Zur Untersuchung der Ren-1^C Reninpromotoraktivität sollten verschieden große Promotorfragmente isoliert, kloniert und anschließend charakterisiert werden. Da sich eine Klonierung von sehr großen PCR-Fragmenten oft sehr schwierig gestaltet, wurde zur Klonierung der 4.2 kb bzw. 2.9 kb langen Fragmente eine „two step“ Klonierungsstrategie gewählt.

Hierzu erfolgte eine Primärklonierung der Fragmente anhand einer TOPO-TA long template cloning[®] Methode und anschließender Umklonierung der Fragmente in die zur Messung der Promotoraktivität verwendeten Luciferase-Reportergenvektoren (pGL3-Enhancer, Promega).

8.1 Auswahl der Abschnitte und Primersequenzen

Die Auswahl der 5'-flankierenden Bereiche des Ren-1^C Reningens und entsprechender Primersequenzen erfolgte aufgrund bereits veröffentlichter Ergebnisse der Ren-1^C Reninpromotoraktivität in AS4.1 Zellen (Sigmund et al., 1990). Sigmund konnte anhand von Transfektionsexperimenten die Aktivität eines 4.2 kb und 2.9 kb langen Fragments des Reninpromotors nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigten kürzere Fragmente, aufgrund der im Bereich zwischen 2866 bp und 2625 bp lokalisierten Enhancerstruktur nur noch basale Aktivitäten.

Für die vorliegenden Untersuchungen sollten nun zwei Fragmente mit 4.2 kb und 2.9 kb Länge kloniert und hinsichtlich ihrer Transkriptionsaktivität bei Stimulation durch die vasokonstriktorisches Hormone Endothelin 3 und Angiotensin II charakterisiert werden.

Die folgende Tabelle zeigt die Basensequenz und Länge der verwendeten Primer:

Fragment	sense Primer	antisense Primer
4.2 kb Fragment (-4071 bis +98)	5'-GCGTGCATGTGGTGTA CATAG-3'	5'-GAGACTGAAGGTGCA AGG-3
2.9 kb Fragment (-2870 bis +98)	5'-TAGTAGACACCAGGAG ATGAC-3'	5'-GAGACTGAAGGTGCA AGG-3

Tabelle 2: Für die PCR-Reaktion verwendete Oligonucleotide (Primer)

8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch exponentiell amplifiziert werden (Mullis et al., 1987). Als Ausgangsprodukt für die PCR wird eine lineare bzw. zirkuläre DNA-Matrize (Template) benötigt, deren Sequenzfolge am 5'-Ende und 3'-Ende bekannt sein muss, so dass zwei spezifisch

bindende Oligonukleotidprimer gewählt werden können. Mittels einer durch eine thermostabile DNA-Polymerase (meist Taq-, Two- bzw. Tth-DNA-Polymerase) katalysierten Reaktion wird der durch das Primerpaar begrenzte DNA-Abschnitt amplifiziert. Die PCR-Reaktion setzt sich aus folgenden Reaktionsschritten zusammen:

1. Auftrennung der doppelsträngigen Matrizen-DNA (bei 94°C)
2. Hybridisierung der Primer an die einzelsträngige DNA-Matrize (meist zwischen 55-60° C)
3. Polymerisation zu Doppelsträngen (meist 72° C = Temperaturoptimum der Taq-Polymerase)

Diese Reaktionsschritte werden in zahlreichen aufeinanderfolgenden Zyklen alternierend durchlaufen. Der zwischen den begrenzenden Primern liegende DNA-Abschnitt wird hierbei exponentiell 2ⁿ-fach (n = Zyklenzahl) verstärkt. Nach Ende des letzten Zyklus erfolgt eine 10minütige Inkubation bei 72°C, um der nur noch teilaktiven DNA-Polymerase das Fertigstellen der zuletzt synthetisierten und zumeist unvollständigen DNA-Stränge zu ermöglichen.

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

Mix 1:

genomische DNA	2 µl (~200ng); (Clontech, 0,1 µg genomische DNA/µl)
dNTP	1,75 µl (350 µM)
5'-Primer	1,5 µl (300 nM)
3'-Primer	1,5 µl (300 nM)
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl
2 min/ 94°C	

Mix 2

10x PCR-Puffer (mit MgCl ₂ 1,75 mM)	5 µl
Enzymmix (Taq- und Two- DNA Polymerase)	1 µl
H ₂ O _{bidest.}	ad 25 µl

Um ein Verdampfen des Ansatzes während der PCR-Reaktion zu vermeiden, wurde der Reaktionsansatz mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma) überschichtet.

Durchführung:

Für die Durchführung der PCR-Reaktion wurde ein Expand-long template PCR System der Fa. Boehringer, Mannheim verwendet.

Nach Denaturierung der genomischen DNA (*Mix1*, 2 min, 94°C) erfolgte der Start der PCR-Reaktion durch Zugabe von *Mix2*.

Für die PCR-Reaktion wurde folgendes PCR-Protokoll verwandt:

94°C	20 sec	<i>Denaturierung</i> der Doppelstränge
65°C	30 sec	<i>Annealing</i> der Primer
68°C	4 min	<i>Extension</i> = optimale Synthesetemperatur des DNA-Polymerasemixes

Es wurden jeweils 30 Zyklen unter den oben aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Nach Ende des letzten Zyklus erfolgte eine 10minütige Inkubation bei 68°C, um den DNA-Polymerasen die Fertigstellung der zuletzt synthetisierten Stränge zu ermöglichen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz vorsichtig unter der Ölschicht abpipettiert und in ein neues Cup überführt.

8.3 TOPO TA long template cloning[®] Methode (Invitrogen)

Bei der vorliegenden Klonierungsmethode handelt es sich um eine hocheffiziente „5 minute one-step“ TA-Klonierungsstrategie zur Klonierung von langen (3-10 kb), mittels der Taq-Polymerase amplifizierten, PCR-Fragmenten in einen durch die Topoisomerase I aktivierten TA-Klonierungsvektor. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Durchführbarkeit einer hoch effizienten Klonierung von langen PCR-Fragmenten bei geringem Zeitaufwand, da keine zusätzlichen Modifikationen des Inserts bzw. des Klonierungsvektors, wie z.B. Herstellung von sticky ends, Ligationsreaktion bzw. Postamplifikationen nötig sind.

8.3.1 Aufreinigung der Fragmente

Um eine hohe Klonierungseffizienz der unter Punkt 8.2 amplifizierten PCR-Produkte zu gewährleisten, erfolgte eine Aufreinigung der Fragmente in einem 0,8%igen Agarosegel durch Gelelektrophorese und anschließender Extraktion.

Da eine herkömmliche Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid zur Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht häufig zur Schädigung der DNA durch Strangbrüche führt und somit die Klonierungseffizienz vermindert wird, wurden die Fragmente mittels Cristal Violet während der Gelelektrophorese angefärbt. Die Fragmente konnten somit bei Normallicht detektiert und extrahiert werden. Nach Kontrolle der Fragmentlänge mittels Längenstandard wurden die PCR-Produkte aus dem Gel ausgeschnitten und unter

Verwendung der im TOPO XL PCR Cloning[®] Kit enthaltenen Säulen (S.N.A.P.[™] purification column) und Lösungen aufgereinigt und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen.

8.3.2 TOPO XL PCR cloning[™]-Reaktion

Reaktionsansatz:

4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (aus 8.3.1)
1 µl pCR[®]-XL-TOPO[®]Vektor

Der Ansatz wurde vorsichtig gemixt, 5 min bei Raumtemperatur (~25°C) inkubiert, nach Zugabe von 1 µl 6x TOPO[®]Cloning Stop Solution und anschließender kurzer Zentrifugation auf Eis gestellt.

Um eine hohe Transformationsrate zu erhalten, wurde die Transformationsreaktion im Anschluss ohne Zeitverzögerung durchgeführt.

6x TOPO[®]Cloning Stop Solution: 0,3 M NaCl
 0,06 M MgCl

8.3.3 One Shot Transformationsreaktion

Die im Kit enthaltenen, kompetenten One Shot[™] Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des TOPO-Cloning[™] Reaktionsansatzes (siehe 8.3.2) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 30 sec), wurde für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl SOC Medium versetzt und in Horizontallage für 1h bei 37°C geschüttelt.

SOC-Medium: 2% Trypton
 0,5% Yeast Extrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 10 mM MgSO₂
 20 mM Glucose

Nach Ende der Wachstumsphase wurden die Zellen auf Eis gestellt, etwa 50-100 µl der jeweiligen Transformationsreaktion auf eine vorgewärmte LB-Platte (versetzt mit 80 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Die LB-Platten wurden nach ca. 12ständiger Inkubation im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank (4°C) gelagert.

8.3.4 Selektion positiver Klone

Da der verwendete pCR[®]-XL-TOPO[®]Vektor ein Kanamycinresistenzgen trägt, konnten nur Klone auf den mit Kanamycin versetzten LB-Platten wachsen, die das Vektor/Insert Konstrukt aufgenommen hatten und somit das für die Resistenz nötige Enzym exprimieren konnten. Die weißen Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 2 ml LB-Medium (mit Kanamycin 80 µg/ml) über Nacht bei 37° C inkubiert.

8.3.5 Animpfen von LB-Kulturen

Zur Verifizierung, dass die gewachsenen Kolonien das richtige Insert aufwiesen, wurden die Plasmide aus den Bakterien isoliert und die Inserts nach einem Kontrollverdau bezüglich ihrer Länge durch Vergleich mit einem Längenstandard identifiziert.

Hierzu wurden pro Agarplatte ca. 8-10 Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 5-6 ml LB-Medium (mit 80 µg/ml Kanamycin) ÜN kultiviert (37°C, Schüttler).

8.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep)

Aus einer 5 ml ÜN-Kultur in LB/Amp.-Medium bzw. LB/Kanamycin-Medium konnten bei High-Copy Plasmiden (hier z.B. pCR[®]-XL-TOPO[®], pGL3-Enhancer) ca. 5 µg Plasmid-DNA gewonnen werden. Der Vorteil dieser Methode liegt im geringen Zeitaufwand, so dass man noch am gleichen Tag das Ergebnis eines Kontrollverdaus erhalten konnte.

Zur Durchführung der Isolation wurden die Lösungen bzw. Puffer des Plasmid Mini Kits der Fa. Qiagen[®] verwendet.

Etwa 3 ml der gut gewachsenen ÜN-Kultur wurden in einem 2.0 ml Eppendorf-Cup pelletiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl P2 wurde nach vorsichtigem Durchmischen für 5 min bei RT inkubiert. Durch das alkalische SDS dieser Lösung wurde die Plasmamembran der Bakterienzellen lysiert und der Zellinhalt freigesetzt. Da die genomische Bakterien-DNA fest mit der Zellmembran assoziiert ist, kann sie zusammen mit dieser entfernt werden, wohingegen die kleine, ringförmige Plasmid-DNA frei, d.h. extrachromosomal in der Zelle (Cytosol) vorliegt. Ein stärkeres Mixen der Zellsuspension ist deshalb zu

vermeiden, da es sonst zu einem Abreißen der an der Membran gebundenen, genomischen DNA kommen könnte. Nach Zugabe von 150 µl P3 wurde für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 15 min, 4°C) und anschließender Isopropanolfällung wurde das Pellet in 20 µl H₂O_{bidest.} gelöst. Die isolierte Plasmidmenge (ca. 5 µg) war ausreichend für einen Kontrollverdau und anschließender Überprüfung des Inserts durch eine Sequenzierung (ca. 1 µg DNA) der Basenfolge.

8.3.7 Kontrollverdau der Plasmide

Um nachzuweisen, dass die isolierte Plasmid-DNA tatsächlich die unter Punkt 8.2 amplifizierten Inserts enthielt, erfolgte ein Doppelverdau der Plasmid-DNA.

8.3.8 Herstellung von Glycerinkulturen

Von den positiven Klonen der Mini-Prep wurden zur langfristigen Lagerung Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 800 µl der ÜN-Kultur mit 200 µl Glycerin versetzt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

8.3.9 Sequenzierung der Inserts

Die endgültige Kontrolle des Inserts, sprich die Ermittlung und Überprüfung der richtigen Basensequenz, erfolgte durch Sequenzierung der Plasmide (SEQUISERVE; Vaterstetten). Hierzu wurden die klonierten Inserts unter Verwendung von T7 bzw. M13 Primern von beiden Seiten des Polylinkerbereichs in 3'-Richtung sequenziert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit der veröffentlichten Sequenz des Ren-1^C Reninpromotorbereichs (Accession Number L78789) verglichen.

8.4 Umklonierung der Ren-1^C Reninpromotorfragmente in Luciferase-Reportervektoren

Nachdem nach Sequenzierung der unter 8.3 hergestellten Klone die korrekte Basensequenz der klonierten Ren1^C-Promotorfragmente sichergestellt war, erfolgte die Umklonierung der Fragmente in pGL-Enhancer Luciferase Reporter Vektoren (Promega).

8.4.1 Vorbereitung der Vektoren und Inserts

Vektor:

Folgende Abbildung zeigt die Sequenz des zur Umklonierung und Messung der Luciferaseaktivität verwendeten pGL3-Enhancer Vektors:

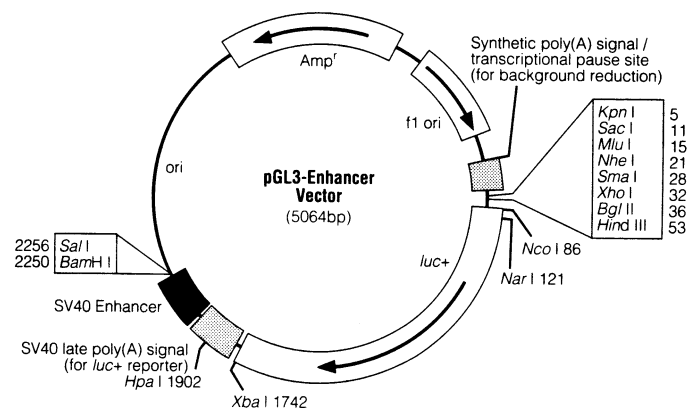


Abb.5 Vektorkarte des pGL3-Enhancer Vektors (aus Promega Katalog 2000)

Die Klonierung der Fragmente erfolgte in den durch Doppelrestriktionsverdau mit SmaI und BglII vorbereiteten Polylinkerbereich des Vektors.

8.4.1.1 Restriktionsverdau der Vektoren und Inserts

Der Verdau des zirkulären Vektors pGL3-Enhancer und der die Promotorfragmente enthaltenden pCR[®]-XL-TOPO Vektoren wurde nach folgendem Reaktionsansatz vorgenommen:

Ansatz:

5 µg pGL3-Enhancer Vektor bzw. pCR[®]-XL-TOPO (mit klonierten Inserts)

25 units SmaI

25 units BglII

20 µl 10x opha Puffer (Endkonzentration 1x)

ad 100 µl H₂O_{bidest.}

Nach 1h bei 37°C wurden weitere 5 units jedes Enzyms zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert.

8.4.1.2 Kontrolle der Vektoren auf vollständigen Restriktionsverdau

Zur Kontrolle des Restriktionsverdaus wurden sowohl der geschnittene Vektor als auch 200 ng des unbehandelten, zirkulären Vektors auf ein 0.8%iges Agarosegel aufgetragen. Als vollständig linearisiert galt der Vektor, wenn nur eine diskrete Bande auftrat und der behandelte Vektor im Vergleich zum zirkulären Vektor deutlich langsamere Laufeigenschaften zeigte.

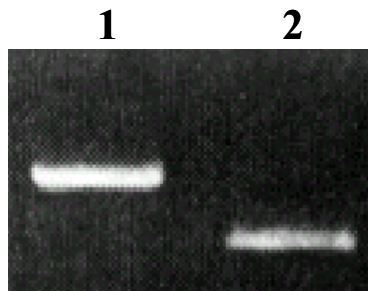


Abb. 6 Agarosegel (1%) mit pGL3-Enhancer Vektor linearisiert (1) und zirkulär (2)

8.4.1.3 Aufreinigung der vorbereiteten Vektoren und Inserts

Der geschnittene Vektor pGL3-Enhancer als auch die mittels Restriktionsverdau aus den pCR[®]-XL-TOPO Vektoren isolierten Inserts wurden auf ein 0.8%iges Agarosegel (mit cristal violett zur Visualisierung) aufgetragen, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und unter Verwendung der unter Punkt 8.3.1 beschriebenen S.N.A.P.TM purification columns aufgereinigt.

8.4.2 Ligationsreaktion

DNA-Fragmente mit glatten bzw. komplementären kohäsiven Enden können durch das Enzym T4 DNA Ligase in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} -Ionen verbunden (ligiert) werden. Hierbei wird eine Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen DNA-Stranges und der 3'-OH-Gruppe des anderen Stranges kovalent geknüpft. Bei der Ligationsreaktion sollte ein Mengenverhältnis Vektor-DNA zu Insert-DNA von 2:1 vorliegen, so dass die Mengen von Vektor und Insert entsprechend zu wählen sind.

Zur Durchführung der Ligation wurde ein Rapid DNA Ligation Kit der Fa.Roche verwendet, mit dessen Hilfe eine Ligationsreaktion in 5 min und anschließender Transformation in kompetente Bakterien vorgenommen werden kann.

Reaktionsansatz:

100 ng pGL3-Ehancer (SmaI/HindIII geschnitten)
50 ng Insert-DNA (SmaI/HindIII geschnitten)
10 µl T4 DNA ligation buffer
ad 20 µl mit DNA dilution buffer
Nach kurzem Vortexen Zugabe von 1 µl T4 DNA Ligase

Die Ligationsreaktion wurde für 5 min bei RT inkubiert und konnte dann direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt werden oder bei -20°C gelagert werden.

8.4.3 Transformation

8.4.3.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Aus einer Glycerinkultur (E.coli, Stamm JM109) wurde eine ÜN-Kultur in 2 ml LB-Medium angezogen. Aus dieser Vorkultur wurde 1 ml in 50 ml frisches LB-Medium überführt und für ca. 2 h bei 37°C inkubiert, bis eine $\text{O.D.}_{600\text{nm}}$ von etwa 0.3 vorlag, das einer Zelldichte von ca. 5×10^7 Zellen/ml entspricht.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4°C , 5 min, 5000 rpm) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in eiskaltem Transformationspuffer 1 (16 ml auf 50 ml Kultur) resuspendiert und für 15 min auf Eis gehalten. Nach nochmaliger Pelletierung der Zellen (4°C , 5 min, 5000 rpm) wurde mit eiskaltem Transformationspuffer 2 (4 ml auf 50 ml Kultur) resuspendiert, die Zellsuspension in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

<i>Transformationspuffer 1:</i>	auf 1 Liter:	
	RbCl ₂	12 g
	MnCl ₂ x4H ₂ O	9.9 g
	Kaliumacetat (1M, pH 7.5)	30 ml
	CaCl ₂ x2H ₂ O	1.5 g
	Glycerol	150.0 g
pH mit 0.2 M Essigsäure auf 8.5 einstellen, steril filtrieren (0.22µm Filter)		

<i>Transformationspuffer 2:</i>	auf einen Liter	
	MOPS (0.5M, pH6.8)	20 ml
	RbCl ₂	1.2 g
	CaCl ₂ x2H ₂ O	11.0 g
	Glycerol	150.0 g
pH mit NaOH auf pH 6.8 einstellen, steril filtrieren (0.22 µm Filter)		

8.4.3.2 Transformation von kompetenten E.coli mit ligiertem Vektor

Zum Ligationsansatz (siehe 8.4.2) wurden 200 µl kompetente E.coli-Zellen (Auftauen auf Eis) gegeben und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2minütigen Hitzeschock bei 42°C wurde 1 ml LB-Medium ohne Ampicillin zugesetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss durch kurzes Zentrifugieren pelletiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abdekantiert und erneut resuspendiert. Anschließend wurde 100µl dieser Zellsuspension auf LB-Agarplatten (mit Ampicillin 80 µg/ml) ausplattiert und ÜN im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

8.4.3.3 Selektion positiver Klone und anschließende Arbeitsschritte

Da der pGL3-Enhancer Vektor keine Selektion mittels eines „Blau-Weiß-Spiels“, aufgrund fehlender β-Galactosidase-Expression ermöglicht, wurden die positiven Klonierungsklone durch Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese anhand der Fragmentlängen des aufgenommenen Inserts charakterisiert.

Hierzu erfolgte zuerst das Animpfen von LB-Kulturen (siehe 8.3.5) mit anschließender Isolation der Plasmid-DNA (siehe 8.3.6) und Kontrollverdau der isolierten Plasmide (siehe 8.3.7).

Nach Sequenzierung und Verifizierung der korrekten Basensequenz (siehe 8.3.9) der klonierten Promotoren wurde eine Glycerinkultur (siehe 8.3.8) angelegt. Zur Durchführung der Transfektionsexperimente wurde die Plasmid-DNA in großer Menge und hohem Reinheitsgrad (ratio mit einem minimal Wert von 1.7) durch einen DNA-Isolationskit der Fa. Qiagen (siehe 5.1.2) isoliert.

8.5 Aufzeichnungsprotokolle

Nachdem durch Sequenzierung der Promotorklone und Sequenzvergleich mit der publizierten Ren-1^C Promotorsequenz (Accession No. L78789) die Richtigkeit der isolierten Klone sichergestellt war, wurde für jeden Klon ein Aufzeichnungsprotokoll laut Gentechnikgesetz (GenTG) angefertigt.

Für jedes hergestellte Konstrukt wurde eine separate Vektorkarte unter Angabe des Versuchsvorhabens, Empfängerorganismus, Selektionsmarker, verwendeter Primersequenzen und eventuell aufgetretener besonderer Vorkommnisse angelegt.

9. Transfektionen

Die Funktionsanalyse von Promotoren verschiedenster Gene kann mittels Transfektionsexperimenten durchgeführt werden. Hierzu werden potentiell regulatorisch wirksame Promotorsequenzen vor sogenannte Reportergene kloniert und die Transkriptionsaktivität anhand Messung der durch den Reportervektor determinierten Genprodukte, meistens durch Bestimmung der Enzymaktivität ermittelt.

9.1 Transfektionsreagenzien

Zur Etablierung eines Transfektionssystems für das As4.1 Zellsystem wurden im Vorfeld zahlreiche liposomale Transfektionsreagenzien hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz und Cytotoxizität auf das verwendete Untersuchungssystem (As4.1-Zellen) charakterisiert. An dieser Stelle soll nur eine kurze Auflistung der getesteten Transfektionsreagenzien erfolgen. Auf das, für die Transfektionsexperimente verwendete Reagenz (FugeneTM6) soll unter Punkt 9.2 näher eingegangen werden.

Getestete Transfektionsreagenzien:

DOTAP transfection reagent (Boehringer; Mannheim)
Dosper (Boehringer; Mannheim)
Superfect (Promega)
FugeneTM6 transfection reagent (Roche)

Zur Etablierung eines Testsystems wurden jeweils verschiedene Mengen (0.1 µg, 0.5 µg, 1.0 µg, 1.5 µg bzw 2.0 µg) des pGL3-control Vektors, des pGL3 Vektors mit 4,2 kb Insert des Ren-1^C Promotors sowie der zur Kotransfektion verwendeten Vektoren pRL-TK und pRL-SV40 mit den oben aufgeführten Transfektionsreagenzien nach Herstellerangaben transfiziert.

Es zeigte sich, dass die verwendeten Reagenzien erhebliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Transfektionseffizienz und Cytotoxizität für das Expressionssystem aufwiesen.

Da mit dem Transfektionsreagenz FugeneTM6 die besten Ergebnisse bezüglich der beschriebenen Untersuchungsparameter erzielt wurden, wurde es zur Durchführung der Transfektionsexperimente verwendet.

9.2 Durchführung der Transfektion

Die Zellen wurden 16 Stunden vor Versuchsbeginn in 24 multi-Wellplatten mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/well subkultiviert. Zur Durchführung der Transfektion wurde das Kulturmedium vollständig entfernt und die Zellen mit dem DNA-Transfektionsreagenzgemisch für 16 Stunden inkubiert. Nach dieser Inkubationsperiode wurde das Gemisch entfernt und es erfolgte eine weitere Inkubationsphase mit den im Kulturmedium gelösten Testsubstanzen.

Herstellung des DNA-Transfektionsreagenz-Komplexes

(Angaben gelten für eine Transfektion pro well)

Mix 1

In ein 1,5 ml Eppendorf-Cup wurde 1 µg Testvektor sowie 0.1 µg des zur Kotransfektion verwendeten pRL-TK Vektors vorgelegt.

Mix 2: Herstellung des FugeneTM6-Kulturmedium-Mixes

in einem 1,5 µl Eppendorf-Cup:
94 µl serumfreies Kulturmedium
6 µl FugeneTM6 (Zugabe erfolgte direkt zum Kulturmedium)

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT erfolgte die tropfenweise Zugabe des Mix 2 zu dem zuvor vorbereiteten Mix 1. Dieses Gemisch wurde zur Ausbildung eines DNA-Transfektionsreagenz-Komplexes für weitere 15 min bei RT inkubiert und nach Zugabe von 500 µl serumhaltigen Mediums wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben.

9.3 Ernte der Zellen

Zur Isolation der transfizierten Zellen wurde das Kulturmedium vollständig aus den 24 Well-Platten entfernt und jedes well mit 500 µl PBS gespült, um etwaiges noch vorhandenes Medium (insbesondere darin enthaltenes FCS) und totes Zellmaterial zu entfernen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100 µl Passive Lysis Buffer (Komponente des Dual Luciferase[®] Reporter Assay Systems) pro well.

Das Lyse-Reagent wurde, um ein ausreichendes Ablösen der Zellen und deren Lyse zu gewährleisten, für ca. 15 min bei RT unter Schütteln auf den Zellen belassen. Die Zelllysate wurden anschließend vollständig in 2.0 ml Eppendorf-Cups überführt und entweder sofort in einen Dual Luciferase Assay eingesetzt, oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei – 20°C für spätere Messungen gelagert.

9.4 Dual Luciferase Assay (Promega)

Die Promotoraktivität der klonierten Maus Ren-1^C Reninpromotorfragmente wurde mittels eines Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems der Fa. Promega bestimmt. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit eine gekoppelte Messung sowohl des, den zu untersuchenden Promotor enthaltenden Testvektors (pGL3 mit *Photinus pyralis* Firefly Luciferase) als auch des zur Bestimmung der Transfektionseffizienz verwendeten co-transfizierten Vektors (pRL-TK mit *Renilla reniformis* Luciferase) in einem Versuchsdurchlauf ohne Änderungen der Versuchsbedingungen durchführen zu können.

Die Herstellung und Lagerung der einzelnen, für das Testsystem notwendigen Lösungen und Reagenzien wurde laut Versuchsanleitung vorgenommen.

Zur Versuchsdurchführung wurde zuerst eine Ernte der As4.1 Zellen wie unter 9.3 beschrieben, vorgenommen. Die geernteten Zellen wurden in ein Eppendorf-Cup überführt, kurz in der Laborzentrifuge zentrifugiert und der Überstand gewonnen. Das Zelllysate

konnte sofort zur Messung herangezogen werden, oder aber bei -80°C nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Die Luciferaseaktivitätsmessung wurde in einem Luminometer (Lumat LB 9501/16; Berthold, Bad Wildbach) zur quantitativen Bestimmung einzelner während der chemischen Reaktion von Firefly- bzw. Renilla-Luciferase mit den Assay Substraten emitierten Lichtquanten durchgeführt. Hierzu wurde 20 μl Zellextrakt in einem Polystyrolröhrchen (Sarstedt) in der Meßapparatur durch automatische Zugabe von 100 μl Luciferase Assay Substrate mit 20sekündiger Messung der Firefly-Luciferase und anschließender Zugabe von 100 μl Stop&GloTM Substrate und ebenfalls 20sekündiger Messung der Renilla-Luciferase vermessen.

Die jeweils ermittelten Firefly- bzw. Renilla- Luciferaseaktivitäten wurden in relative light units (RLU) angegeben.

10. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurde für interindividuelle Vergleiche die einfaktorielle Varianzanalyse (*ANOVA*) und für intraindividuelle Vergleiche der zweiseitige *student's t-test* verwendet. Für alle Ergebnisse wurde der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und die statistische Schwankung des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) angegeben.

III. Ergebnisse

1. Einfluss von Angiotensin II auf die Reningenexpression und Reninsynthese in As4.1 Zellen

1.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Renin mRNA Abundanz

1.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Zur Untersuchung eines möglichen dosisabhängigen Einflusses von Angiotensin II (ANGII) auf die basale Renin mRNA Abundanz wurde eine Dosis-Wirkungskurve ermittelt. Hierzu wurden die As4.1 Zellen mit verschiedenen Angiotensin II Konzentrationen über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert.

Angiotensin II führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Renin mRNA Abundanz mit einer signifikanten Suppression der Reningenexpression bei 10 nmol/l und einem halbmaximalen Effekt (EC_{50}) bei 100 nmol/l. Eine Dosis von 10 μ mol/l führte zu einer maximalen Abnahme der Renin mRNA Abundanz auf ca. 35 % des Kontrollniveaus (Abb. 7).

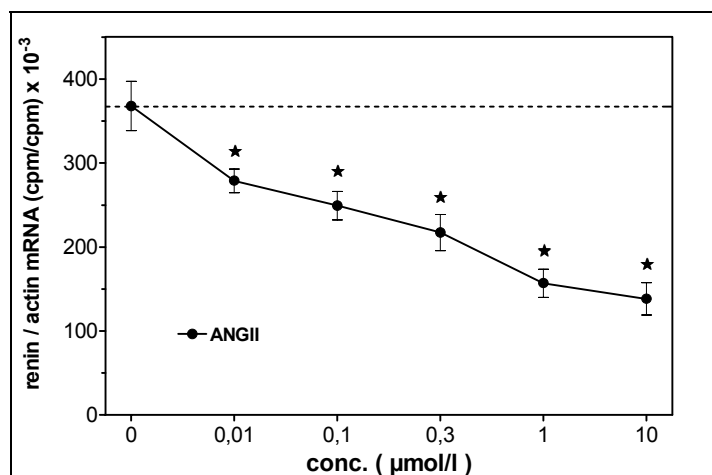


Abb 7: Dosis-Wirkungsbeziehung von Angiotensin II (ANGII) auf die basale Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Konzentration dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★ $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingung.

Angiotensin II zeigte keine Wirkung auf die β -Aktin mRNA Abundanz (Daten nicht gezeigt), so dass β -Aktin als interner Standard verwendet werden konnte und alle Quantifizierungen der RNase Protection Assays als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben werden.

1.1.2 Zeitverlauf der Angiotensin II Wirkung

Zur Ermittlung des Zeitverlaufs der Angiotensin II Wirkung auf die Renin mRNA Abundanz wurden die Zellen mit 1 μ mol/l Angiotensin II (ANGII) inkubiert und die Renin mRNA Expression zum Zeitpunkt 0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h und 16h bestimmt.

Angiotensin II zeigte bereits nach 4 Stunden eine signifikante Abnahme der Renin mRNA Abundanz auf ca. 73 % des Kontrollwerts und einen maximalen Effekt nach 16 Stunden mit ca. 36 % des Kontrollniveaus. Ein halbmaximaler Effekt wurde nach ca. 8 Stunden erreicht (Abb. 8).

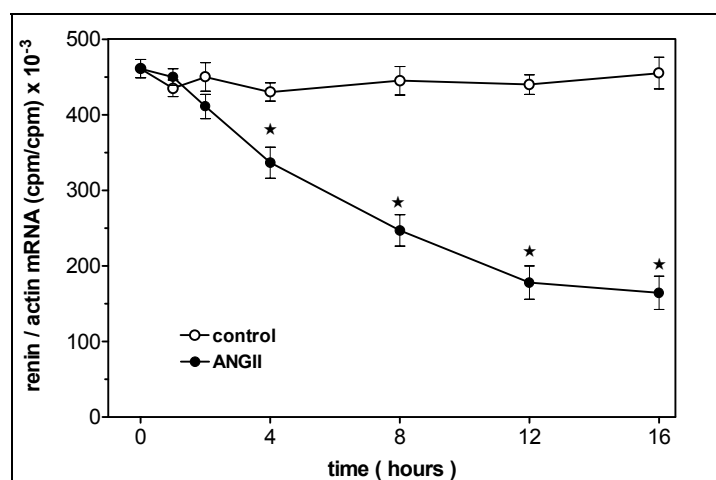


Abb. 8: Zeitverlauf der Angiotensin II (ANGII) Wirkung (1 μ mol/l) auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen.

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

1.2 Signaltransduktion von Angiotensin II

Angiotensin II führt in vielen Zelltypen über eine Bindung an den AT1-Rezeptor zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die Phospholipase C katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-

trisphosphat (IP_3) und führt damit zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG und einen durch IP_3 gesteuerten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Im folgenden wurde daher der Angiotensin II Signaltransduktionsweg, im besonderen eine Signaltransduktion via der Proteinkinase C im As4.1 Zellsystem näher charakterisiert.

1.2.1 Bestimmung der Proteinkinase C Aktivität

Um zu überprüfen, ob Angiotensin II zu einer Aktivierung der Proteinkinase C in As4.1 Zellen führt, wurden die Zellen mit $1 \mu\text{mol/l}$ Angiotensin II, 100 nmol/l Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), einem direkten Aktivator der PKC und 100 nmol/l 4α -Phorbol-12,13-didecanoate (4α -PDD), einem schwachen Aktivator der PKC inkubiert und die PKC Aktivität nach 16 Stunden bestimmt.

Angiotensin II führte zu einer Erhöhung der PKC Aktivität auf $270 \pm 15.8 \%$ der Kontrolle. Der Phorbol-ester PMA zeigte eine vergleichbare Aktivierung auf $365 \pm 14.5 \%$ des Kontrollniveaus, wohingegen 4α -PDD keine signifikante Wirkung hatte (Abb. 9).

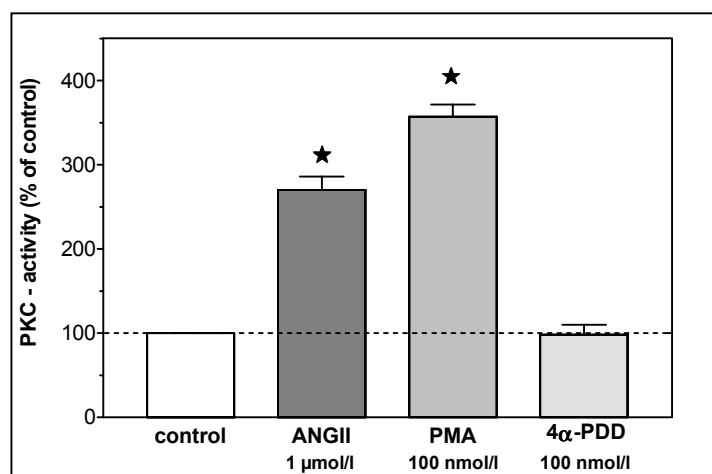


Abb. 9: Proteinkinase C (PKC) Aktivität in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Messung der PKC Aktivität erfolgte mittels eines ELISA Protein Kinase Assay Kits nach 16-stündiger Inkubation mit $1 \mu\text{mol/l}$ Angiotensin II, 100 nmol/l PMA und 100 nmol/l 4α -PDD. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM (% der Kontrolle) aus acht Messungen pro Bedingung dar (n=8). ★ $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingung.

1.2.2 Einfluss einer Proteinkinase C Inhibierung auf die Angiotensin II Effekte

1.2.2.1 Einfluss einer direkten PKC Hemmung unter basalen Bedingungen

Durch Bisindolylmaleimide I (BIM), einem selektiven Inhibitor der Proteinkinase C (Toullec et al., 1991), wurde der Einfluss einer direkten Inhibierung der PKC auf die basale Renin mRNA Abundanz untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit 100 nmol/l, 300 nmol/l und 1 μ mol/l Bisindolylmaleimide I für 16 Stunden inkubiert.

Der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I hatte keine signifikante Wirkung auf die basale Renin mRNA Abundanz (Abb. 10).

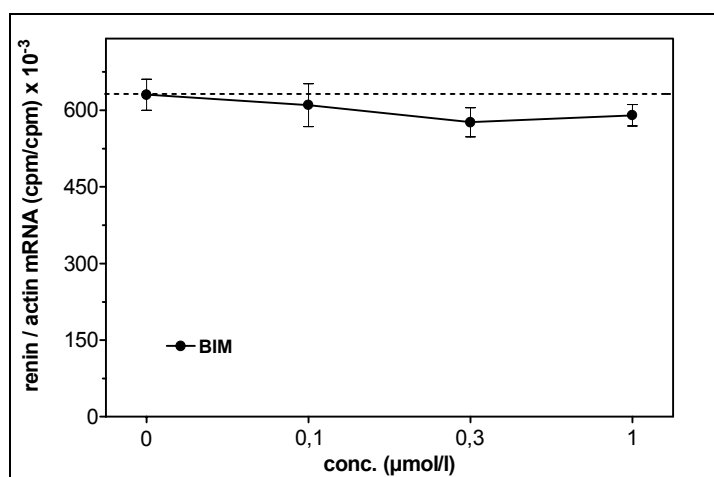


Abb. 10: Effekte von Bisindolylmaleimide I auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus vier Messungen pro Konzentration dar (n=4). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt.

1.2.2.2 Dosis-Wirkungsbeziehung von Bisindolylmaleimide I auf die Angiotensin II Effekte

Nachdem der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I (BIM) keine Wirkung auf die basale Renin mRNA Expression zeigte, wurde eine konzentrationsabhängige Wirkung von BIM auf die durch Angiotensin II induzierte Suppression der Renin mRNA Abundanz untersucht. Hierzu erfolgte eine 16-stündige Inkubation der Zellen mit Angiotensin II (1 μ mol/l) bzw. mit Angiotensin II (1 μ mol/l) in Kombination mit verschiedenen BIM Konzentrationen (100 nmol/l, 300 nmol/l, 1 μ mol/l).

Angiotensin II führte zu einer Suppression der Renin mRNA Expression auf ca. 51 % der Kontrolle. Dieser inhibitorische Effekt wurde von BIM in einer Konzentration von 300 nmol/l signifikant abgeschwächt. Eine Dosis von 1 μ mol/l BIM zeigte eine maximale

Abschwächung der Angiotensin II Wirkung auf 89 % des Kontrollniveaus im Vergleich zur ANG II Wirkung mit 51 % des Kontrollwerts (Abb. 11).

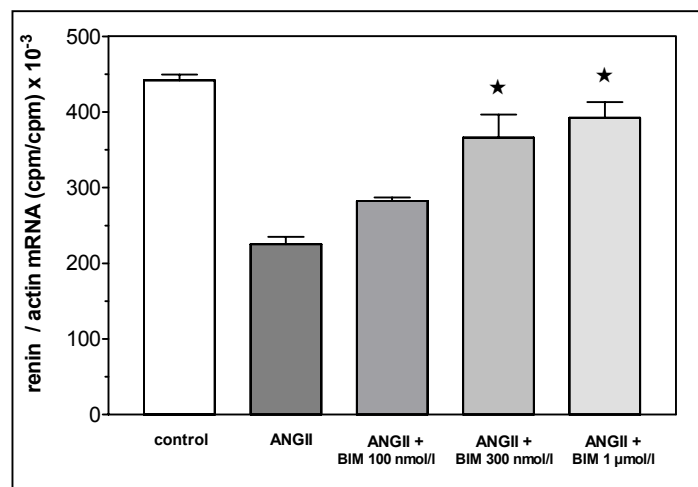


Abb. 11: Effekte von Angiotensin II (1 µmol/l) und Angiotensin II (1 µmol/l) in Kombination mit verschiedenen Bisindolylmaleimide I Konzentrationen auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Werte werden als Renin/β-Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte ± SEM aus sechs Messungen pro Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 µg (Renin) bzw. 1 µg (β-Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Angiotensin II Behandlung.

1.2.2.3 Zeitverlauf der Bisindolylmaleimide I Wirkung auf die Angiotensin II Effekte

Im weiteren wurde der Zeitverlauf der Angiotensin II Wirkung (1 µmol/l) und der Kombination von 1 µmol/l Angiotensin II mit 1 µmol/l Bisindolylmaleimide I ermittelt. Angiotensin II führte zu einer zeitabhängigen Suppression der Renin mRNA Abundanz. Dieser inhibitorische Effekt wurde bei der Kombination von Angiotensin II mit BIM nach 8 Stunden Inkubationszeit bis zum Ende der Versuchsreihe nach 16 Stunden signifikant abgeschwächt (Abb. 12).

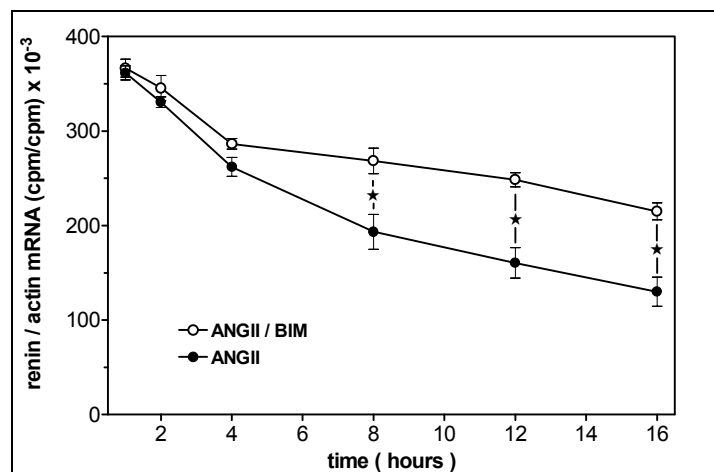


Abb. 12: Zeitverlauf der Angiotensin II (1 μ mol/l) Wirkung und einer Kombination von Angiotensin II (1 μ mol/l) mit Bisindolylmaleimide I (1 μ mol/l) auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen.

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Angiotensin II Behandlung.

1.2.3 Direkte Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolester

Nachdem die Experimente mit dem PKC-Inhibitor BIM eine signifikante Abschwächung der ANGII Wirkung auf die Renin mRNA Abundanz zeigten, wurde im folgenden untersucht welche Wirkung eine direkte Stimulation der PKC auf die Reningenexpression ausübt. Hierzu wurde der PKC-Aktivator Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) und als Kontrolle der Phorbolester 4 α -Phorbol-12,13-didecanoate (4 α -PDD) verwendet.

1.2.3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Zunächst wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung der Phorbolester PMA und 4 α -PDD auf die Renin mRNA Abundanz untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen PMA- bzw. 4 α -PDD Konzentrationen über einen Zeitraum von 16 Stunden inkubiert.

PMA zeigte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Renin mRNA Expression mit einem halbmaximalen Effekt (EC₅₀) bei ca. 10 nmol/l und einer maximalen Hemmung auf 21 % des Kontrollniveaus bei 300 nmol/l. Der Phorbolester 4 α -PDD hatte über den gesamten Konzentrationsbereich keine signifikante Wirkung auf die Renin mRNA Abundanz (Abb. 13).

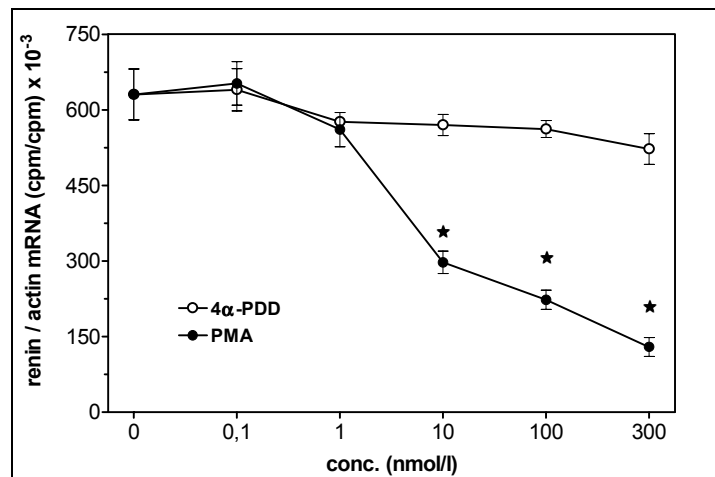


Abb.13: Dosis-Wirkungsbeziehung von PMA bzw. 4α-PDD auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Werte werden als Renin/β-Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte ± SEM aus sechs Messungen pro Versuchsbedingung dar (n=6). Es wurden 10 µg (Renin) bzw. 1 µg (β-Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

1.2.3.2 Zeitverlauf der PMA Wirkung

Ferner wurde die Zeitabhängigkeit der PMA Wirkung auf die basale Renin mRNA Expression ermittelt. Die Zellen wurden mit 100 nmol/l PMA bzw. 100 nmol/l 4α-PDD inkubiert und die Renin mRNA Abundanz nach 0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16h und 24h bestimmt.

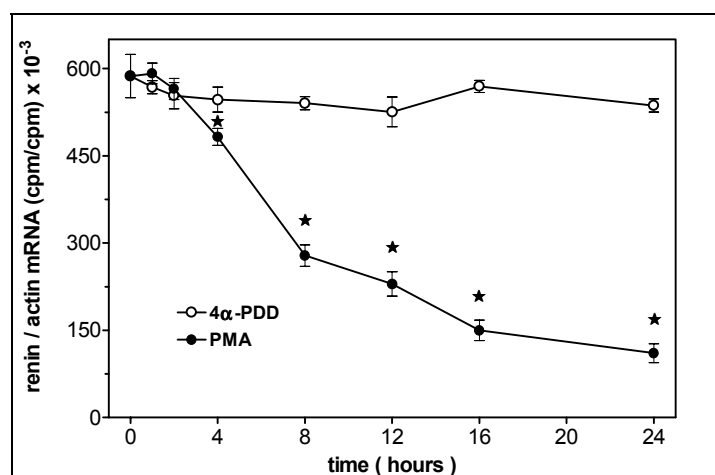


Abb. 14: Zeitverlauf der PMA (100 nmol/l) und α-PDD (100nmol/l) Wirkung auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen.

Die Werte werden als Renin/β-Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte ± SEM aus sechs Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 µg (Renin) bzw. 1 µg (β-Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

PMA zeigte bereits nach 4 Stunden eine signifikante Suppression der Renin mRNA Expression auf 82 % der Kontrolle und einen maximalen Effekt mit 19 % des

Kontrollniveaus nach 24 Stunden. Ein halbmaximaler Effekt war nach ca. 8 Stunden erreicht. Der Phorbolster 4α -PDD hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Renin mRNA Abundanz (Abb. 14).

1.2.3.3 Dosis-Wirkungsbeziehung von Bisindolylmaleimide I auf die PMA Effekte

Zur Aufklärung einer dosisabhängigen Wirkung von Bisindolylmaleimide I auf eine durch PMA induzierte Abnahme der Renin mRNA Expression erfolgte eine 16-stündige Inkubation mit PMA (100 nmol/l) oder einer Kombination von PMA (100 nmol/l) mit verschiedenen Bisindolylmaleimide I Konzentrationen (100 nmol/l, 300 nmol/l, 1 μ mol/l). PMA alleine bewirkte eine Reduktion der Renin mRNA Abundanz auf ca. 34 % des Kontrollniveaus, wohingegen die Kombination PMA/300 nmol/l BIM zu einer signifikanten Reduktion und PMA/1 μ mol/l BIM zu einer maximalen Reduktion der PMA Wirkung führte (Abb. 15).

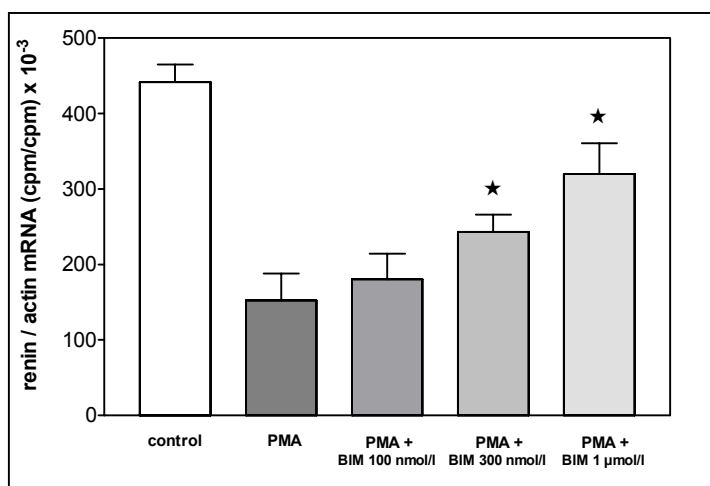


Abb. 15: Effekte von PMA (100 nmol/l) und PMA (100 nmol/l) in Kombination mit verschiedenen Bisindolylmaleimide I Konzentrationen auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. *p<0.05 vs. PMA Behandlung.

1.2.3.4 Zeitverlauf der Bisindolylmaleimide I Wirkung auf die PMA Effekte

Als nächstes wurde der Zeitverlauf der PMA Wirkung (100 nmol/l) und der Kombination von 100 nmol/l PMA mit 1 μ mol/l BIM ermittelt.

Wie Abb.16 verdeutlicht, bewirkte 100 nmol/l PMA eine wie bereits unter Punkt 1.2.3.2 dargestellte zeitabhängige Inhibierung der Renin mRNA Expression. Bei gleichzeitiger Inkubation von PMA mit BIM wurde der inhibitorischen Effekt von PMA nach 8 Stunden bis zum Ende der Inkubationsdauer (t=16 h) signifikant abgeschwächt (Abb. 16).

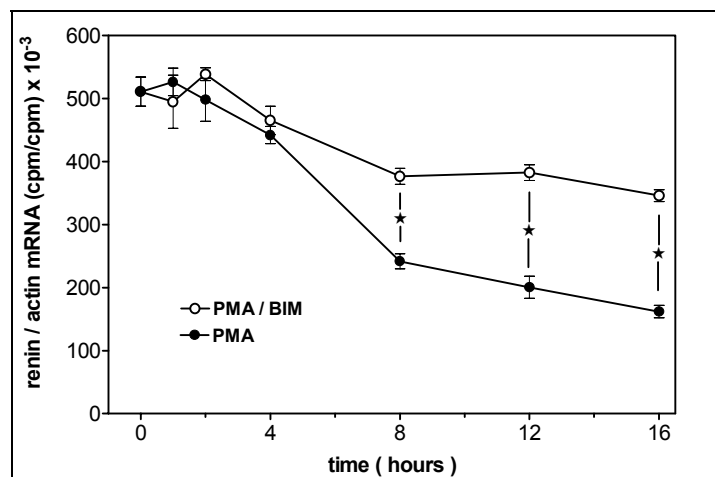


Abb. 16: Zeitverlauf der PMA (100 nmol/l) Wirkung und einer Kombination von PMA (100 nmol/l) mit Bisindolylmaleimide I (1 μ mol/l) auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen.

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. PMA Behandlung.

1.3 Einfluss von Angiotensin II auf die Reninsynthese

Durch Bestimmung der Gesamtreninaktivität wurde der Einfluss von Angiotensin II und einer direkten Aktivierung der PKC durch PMA auf den Reningehalt und somit auf die Reninsynthese in der Zelllinie As4.1 untersucht.

Da die As4.1 Zellen einen Großteil des transkribierten und translatierten Reninproteins als enzymatisch inaktives Prorenin konstitutiv sezernieren (Sigmund et al., 1990), erfolgte zur Ermittlung der Gesamtreninaktivität eine Aktivierung des Proreninanteils zu enzymatisch aktivem Renin mittels Trypsinbehandlung.

In verschiedenen Vorversuchen wurde eine optimale Trypsinkonzentration (0.3 mg/ml für das Zelllysat bzw. 0.5 mg/ml für den Überstand; 30 min RT) zur Umwandlung des inaktiven Prorenins in das aktive Renin ermittelt.

Angiotensin II (1 $\mu\text{mol/l}$) führte nach 16 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der Reninaktivität von 14.91 ± 0.71 ngANGI/h/100 μl auf 10.31 ± 0.48 ngANGI/h/100 μl , das einer Abnahme auf ca. 69 % der Kontrolle entsprach. Der Phorbolester PMA (100 nmol/l) zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Reninaktivität auf 6.98 ± 0.52 ngANGI/h/100 μl (ca. 47 % des Kontrollniveaus), wohingegen 4 α -PDD keine signifikante Wirkung auf die Reninaktivität hatte (Abb. 17).

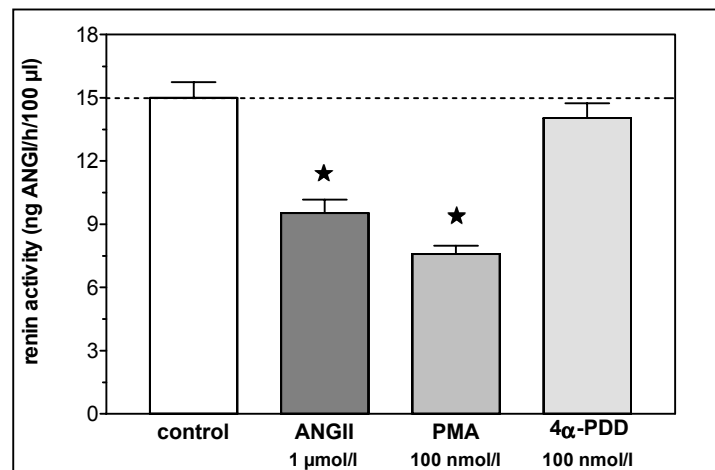


Abb. 17: Effekte von Angiotensin II (1 $\mu\text{mol/l}$), PMA (100 nmol/l) und 4 α -PDD (100 nmol/l) auf die Gesamtreninaktivität (ng ANG I/h/100 μl) in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubationszeit isoliert und die Reninaktivität nach Aktivierung von intrazellulärem bzw. sezerniertem Prorenin in aktives Renin mittels Trypsinbehandlung anhand eines ANG I Radioimmuno Assays bestimmt. Die Werte werden in (ngANGI/h/100 μl) angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen mit jeweils vier unabhängigen Messungen pro Bedingung und Experiment dar.

★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

1.4 Wirkungsmechanismus von Angiotensin II

Eine Abnahme der mRNA Abundanz kann entweder durch eine verminderte Stabilität der mRNA oder durch eine Hemmung der Transkription bedingt sein. Im folgenden wurde der durch Angiotensin II bzw. PMA auf die Renin mRNA Abundanz ausgeübte inhibitorische Effekt näher charakterisiert.

1.4.1 Einfluss von Angiotensin II auf die Renin mRNA Stabilität

Um eine mögliche post-transkriptionelle Regulation der Renin mRNA Abundanz zu untersuchen, wurde die *de novo* mRNA Synthese durch Actinomycin D, einem potenten Inhibitor der RNA-Polymerase gehemmt. Durch Bestimmung der Renin mRNA Halbwertszeit wurde der Einfluss von ANG II auf die Renin mRNA Stabilität untersucht.

Die Zellen wurden parallel entweder mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II in Gegenwart von Actinomycin D (10 $\mu\text{g/ml}$) oder ausschließlich mit Actinomycin D (10 $\mu\text{g/ml}$) für 4h, 8h, 12h und 16h inkubiert und anschließend die Renin mRNA quantifiziert.

Angiotensin II hatte keinen Einfluss auf den Zeitverlauf der Renin mRNA Abundanz nach Hemmung der Transkription. Die Renin mRNA Halbwertszeit lag sowohl bei Inkubation mit Actinomycin D als auch bei der Kombination von Angiotensin II mit Actinomycin D bei ca. 9 Stunden (Abb. 18). Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass ANGII eine wesentliche Verminderung der Renin mRNA Stabilität bewirkt.

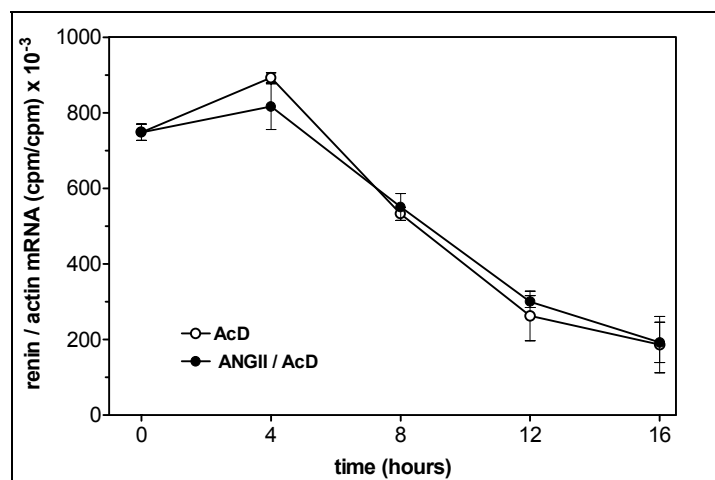


Abb. 18: Effekte von Angiotensin II (1 $\mu\text{mol/l}$) auf die Renin mRNA Halbwertszeit nach Blockade der Transkription durch Actinomycin D (AcD: 10 $\mu\text{g/ml}$).

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus vier Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar ($n=4$). Es wurden 10 μg (Renin) bzw. 1 μg (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss einer direkten Aktivierung der Protein-kinase C auf die Renin mRNA Stabilität untersucht. Hierzu wurden die Zellen in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D entweder mit oder ohne PMA (100 nmol/l) inkubiert und die Kinetik der Renin mRNA Abundanz nach 4h, 8h, 12h und 16h ermittelt. Die Aktivierung der PKC durch den Phorbolster PMA zeigte ebenso wie Angiotensin II keinen Einfluss auf den Zeitverlauf der Renin mRNA Abundanz nach Hemmung der Transkription durch Actinomycin D. Die Renin mRNA Halbwertszeit lag sowohl bei Actinomycin D als auch bei der Kombination Actinomycin D/PMA bei ca. 9 Stunden (Abb. 19). Die PKC scheint somit keinen Einfluss auf die Renin mRNA Stabilität zu bewirken.

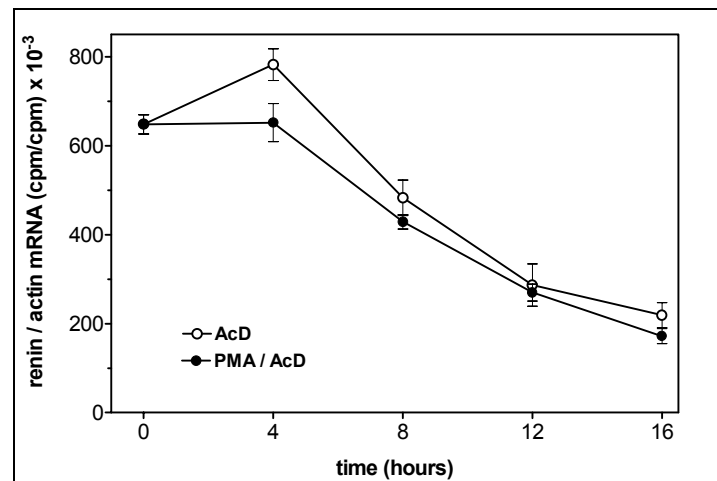


Abb. 19: Effekte von PMA (100 nmol/l) auf die Renin mRNA Halbwertszeit nach Blockade der Transkription durch Actinomycin D (AcD: 10 µg/ml).

Die Werte werden als Renin/β-Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte ± SEM aus vier Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar (n=4). Es wurden 10 µg (Renin) bzw. 1 µg (β-Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt.

1.4.2 Transkriptionelle Regulationsmechanismen

Nachdem die vorangegangenen Versuche zur Bestimmung der Renin mRNA Stabilität keine Hinweise auf eine durch Angiotensin II bzw. PMA induzierte post-transkriptionelle Regulation der Renin mRNA Abundanz ergaben, wurde im folgenden eine mögliche transkriptionelle Regulation der Reningenexpression durch Untersuchungen der Ren-1^C Promotoraktivität abgeklärt.

1.4.2.1 Klonierung verschiedener Ren-1^C Promotorfragmente

Zur Untersuchung transkriptioneller Regulationsprozesse wurden verschiedene Ren-1^C Promotorfragmente isoliert und kloniert und die Promotoraktivität der Konstrukte nach Inkubation mit Angiotensin II bzw. PMA ermittelt.

Die Auswahl der klonierten 5'-flankierenden Bereiche des Ren-1^C Reningens erfolgte aufgrund bereits im Vorfeld dieser Arbeit veröffentlichter Ergebnisse bezüglich der Ren-1^C Promotoraktivität in der Zelllinie As4.1 (Petrovic et al., 1996). Petrovic et al. hatten anhand von Promotorstudien die Funktionalität eines 4.2 kb als auch 2.9 kb langen Fragments des 5'-flankierenden Bereichs nachgewiesen. Im Gegensatz dazu, zeigten kürzere Abschnitte des Reninpromotors wegen einer im Bereich zwischen Position -2866 bp und -2625 bp lokalisierten Enhancerstruktur nur noch geringe Aktivitäten.

Für die vorliegenden Promotorstudien wurden zwei Fragmente mit 4.2 kb bzw. 2.9 kb Länge mittels einer PCR-Reaktion und anschließender Klonierung isoliert (näheres siehe Punkt II.8) und bezüglich ihrer Transkriptionsaktivität nach Inkubation mit Angiotensin II bzw. PMA charakterisiert.

Die folgende Tabelle zeigt die Basensequenz und Länge der zur Klonierung verwendeten Primer:

Fragment	sense Primer	antisense Primer
4,2 kb Fragment (-4071 bis +98)	5'-GCGTGCATGTGGTGTA CATAG-3'	5'-GAGACTGAAGGTGC AAGG-3'
2,9 kb Fragment (-2870 bis +98)	5'-TAGTAGACACCAGGAG ATGAC-3'	5'-GAGACTGAAGGTGC AAGG-3'

Anmerkung:

Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte anhand der in der Datenbank GenBank (Accession Number: L78789) veröffentlichten Sequenz des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens.

Zur Funktionsanalyse des Ren-1^C Promotors wurden die isolierten 5'-flankierenden Bereiche vor ein Reportergen kloniert. Zur Auswahl stand hierbei das Luciferase Gen aus *Photinus pyralis* sowie die bakteriellen Gene für die Enzyme Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) bzw. β -Galactosidase. Aufgrund der besseren Reproduzierbarkeit, höheren Sensitivität (100 bis 1000 fach sensitiver als die genannten Gene) und einfacheren Handhabung wurde in der vorliegenden Arbeit der Luciferase Reporter Vektor pGL3-Enhancer (Promega) zur Herstellung der Ren-1^C Promotor Reportergenkonstrukte verwandt. Ein weiterer Vorteil dieses Luciferase Vektors liegt in seiner Einsatzmöglichkeit in einem Dual-Luciferase Assay System. Bei diesem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Meßsystem handelt es um eine integrierte Messung sowohl des Reportergenkonstrukts als auch eines zur Standardisierung der Transfektionseffizienz cotransfizierten Renilla Reportergen Vektors mit dem Luciferase Gen aus *Renilla reniformis*.

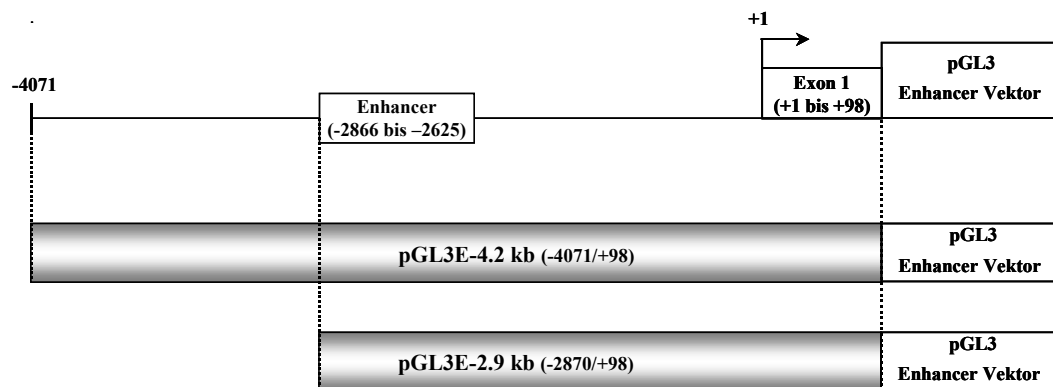


Abb. 20: Schematische Darstellung der klonierten Reporter-genkonstrukte

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der klonierten Ren-1^C Promotorfragmente in den Reporter-genvektoren pGL3 Enhancer mit dem Luciferase Gen aus *Photinus pyralis*. Das Konstrukt pGL3E-4.2 kb enthält den Bereich von -4071 bp bis +98 bp und das Konstrukt pGL3E-2.9 kb den Bereich von -2870 bp bis +98 bp des Ren-1^C Gens. Beide Konstrukte enthalten die an Position -2866 bp bis -2625 bp lokalisierte Enhancerstruktur und einen Bereich des Exon 1 von +1 bis +98. +1 bezeichnet den Transkriptionsstartpunkt.

1.4.2.2 Etablierung des Transfektionssystems

Zur Etablierung eines Transfektionssystems für das As4.1-Zellsystem wurden verschiedene liposomale Transfektionsreagenzien bezüglich ihrer Transfektionseffizienz und ihrer Cytotoxizität für das verwendete Expressionssystem (As4.1-Zellen) untersucht und charakterisiert.

Gleichzeitig wurden verschiedene Mengen an Plasmid-DNA transfiziert und durch Bestimmung der jeweiligen Luciferaseaktivitäten eine optimale Menge an zu transfizierender Plasmidmenge sowohl der Reporter-genkonstrukte als auch der cotransfizierten Kontrollvektoren ermittelt.

Folgende Transfektionsreagenzien wurden getestet:

DOTAP (Boehringer Mannheim)

DOSPER (Boehringer Mannheim)

Superfect (Promega)

FugeneTM6 (Roche)

Zur Etablierung eines Testsystems wurden jeweils unterschiedliche Mengen (0.1 µg, 0.5 µg, 1.0 µg, 1.5 µg, 2.0 µg) des pGL3-control Vektors (SV40-Promotor), des pGL3E-4.2 kb Reporter-genkonstrukts sowie der zur Cotransfektion verwendeten Renilla-Vektoren

pRL-TK (Thymidin Kinase Promotor) bzw. pRL-SV40 (SV40-Promotor) mit den oben aufgeführten Transfektionsreagenzien nach Herstellerangaben transfiziert.

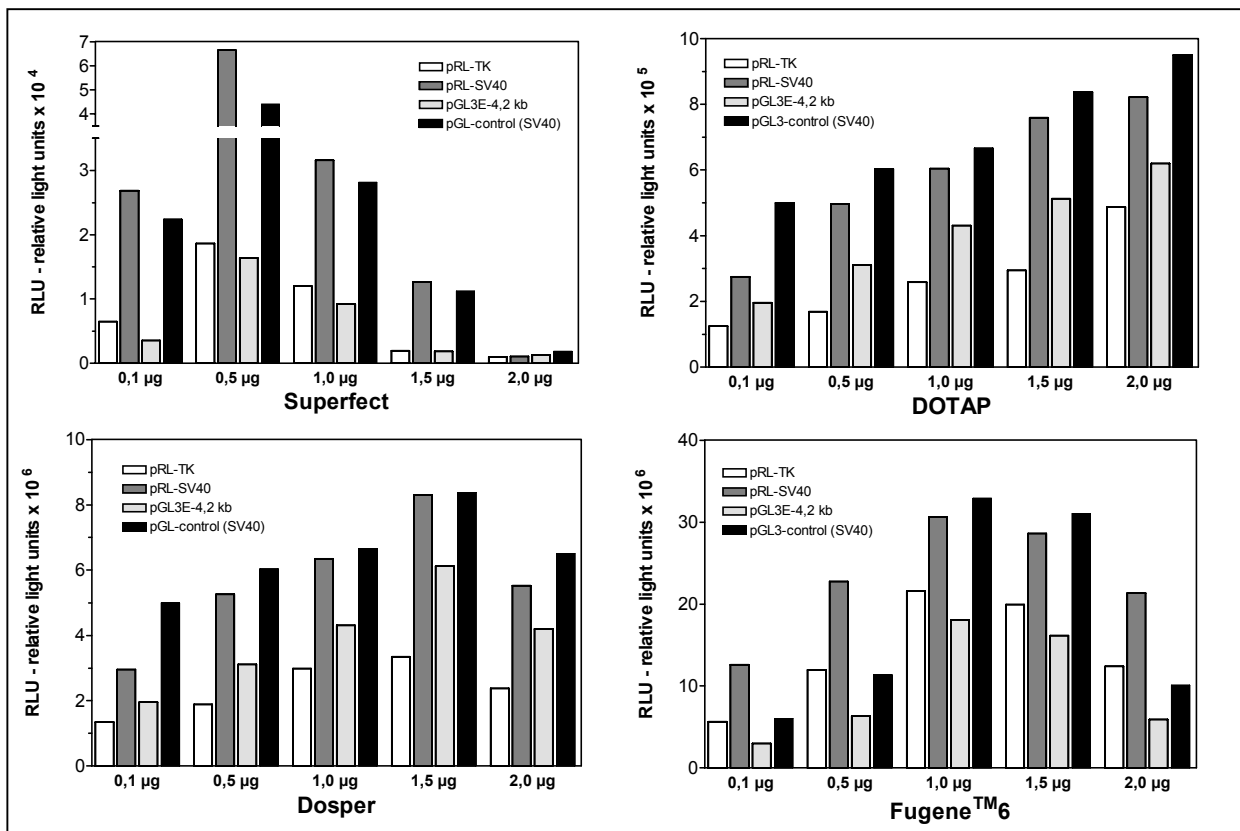


Abb. 21: Transfektionseffizienz verschiedener Transfektionsreagenzien.

Mit den aufgeführten Transfektionsreagenzien wurden jeweils verschiedene Mengen (0.1 µg, 0.5 µg, 1.0 µg, 1.5 µg, 2.0 µg) an Reportergenvektoren (pRL-TK, pRL-SV40, pGL3-control, pGL3E-4.2 kb) nach Herstellerangaben transfiziert. Bei den Vektoren pRL-TK und pRL-SV40 steht das *Renilla reniformis*-Luciferase Gen unter der Kontrolle des Thymidin Kinase Promotors (pRL-TK) bzw. unter der Kontrolle des SV40-Promotors (pRL-SV40). Die Vektoren pGL3-control und pGL3E-4.2 kb exprimieren das *Photinus pyralis* Luciferase Gen, das entweder unter der Kontrolle des SV40-Promotors (pGL3-control) oder unter der Kontrolle des Ren-1^C Promotors (pGL3E-4.2 kb) steht. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte durch Messung der Luciferase-Aktivitäten. Die Werte werden in RLU (relative luciferase light units) angegeben und stellen Mittelwerte aus vier Messungen dar.

Wie in Abb. 21 ersichtlich, zeigte das Transfektionsreagenz Fugene™6 im Vergleich mit den anderen verwendeten Reagenzien, die mit Abstand höchste Transfektionseffizienz bei gleichzeitig geringer Cytotoxizität (lichtmikroskopische Kontrolle) für das Zellsystem und wurde deshalb für alle weiteren Transfektionen verwendet.

Für die folgenden Transfektionsexperimente wurden 1.0 µg an Reportergenkonstrukt (pGL3E-2.9 kb bzw. pGL3E-4.2 kb) zur Bestimmung der Ren-1^C Promotoraktivität sowie 0.1 µg an pRL-TK Vektor zur Cotransfektion gewählt.

1.4.2.3 Promotorstudien

Zur Untersuchung der Ren-1^C Promotoraktivität wurden die Zellen mit den Konstrukten pGL3E-4.2 kb bzw. pGL3E-2.9 kb transfiziert und die Transkriptionsaktivität nach 16-stündiger Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II, 100 nmol/l PMA bzw. 100 nmol/l 4 α -PDD durch Messung der Luciferaseaktivität mittels eines Dual Luciferase Assays bestimmt.

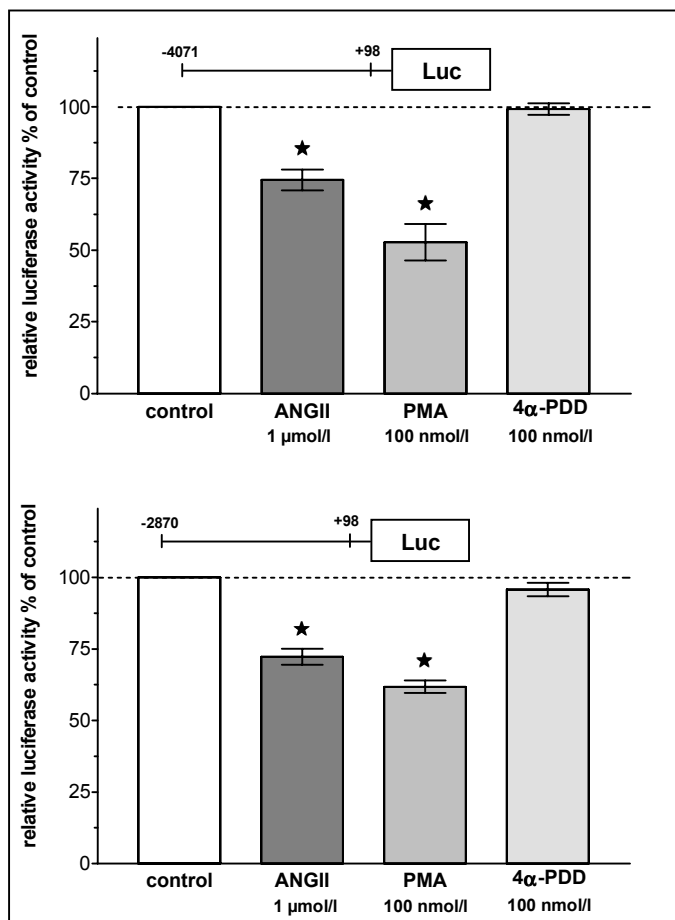


Abb. 22: Wirkung von Angiotensin II (1 $\mu\text{mol/l}$) und PMA (100 nmol/l) auf die Promotoraktivität der Ren-1^C Promotor Reportergenkonstrukte pGL3E-4.2 kb bzw. pGL3E-2.9kb in As4.1 Zellen (t=16h).

Die mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten Zellen wurden für 16 Stunden mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Angiotensin II bzw. 100 nmol/l PMA inkubiert. 4 α -PDD diente als interne Kontrolle. Die Luciferaseaktivität (RLU) wurde durch den Backgroundwert korrigiert und ins Verhältnis zur Luciferaseaktivität (RLU) des cotransfizierten pRL-TK Vektors gesetzt. Die Auftragung bezieht sich auf die basale Promotoraktivität der unbehandelten Kontrolle die zu 100 % gesetzt wurde. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen mit jeweils vier unabhängigen Messungen pro Versuch und Bedingung dar. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

Angiotensin II (1 $\mu\text{mol/l}$) führte sowohl zu einer Abnahme der Promotoraktivität des pGL3E-4.2 kb Konstrukts (74 \pm 2.7 %) als auch des pGL3E-2.9 kb Konstrukts mit 74 \pm 2.8 % der Kontrolle. Der Phorbolster PMA zeigte ebenfalls eine Suppression der Transkriptionsaktivität mit 65 \pm 2.5 % (pGL3E-4.2 kb) bzw. 60 \pm 5.3 % des

Kontrollniveaus (pGLE-2.9 kb), wohingegen 4 α -PDD bei beiden Konstrukten keine signifikante Wirkung hatte (Abb. 22).

1.4.2.4 Deletionsstudien

Die vorliegenden Ergebnisse weisen auf eine Signaltransduktion von Angiotensin II via der Proteinkinase C hin. Eine direkte Aktivierung der PKC z.B. durch Phorbol ester kann zu einer Aktivierung von c-Jun führen und somit die Bindung des Transkriptionsfaktors AP1 an die AP1-Konsensussequenz induzieren. Eine Beteiligung von AP1-Bindungssequenzen an der ANGII Signaltransduktion erscheint daher möglich. Im folgenden wurde die Bedeutung von zwei im proximalen Promotorbereich des Ren-1^C Gens lokalisierter AP1-Bindungsstellen durch Deletionsstudien untersucht. Diese beiden AP1-Bindungsstellen wurden bereits in einer früheren Arbeit (Tamura et al., 1998) im Zusammenhang mit einer c-Jun regulierten Reninexpression diskutiert.

Zur Herstellung der Deletionsmutanten erfolgte eine vollständige Deletion der an Position -16 bis -22 (AGGCTCA Bindungsmotiv) und Position -141 bis -147 (TGACTGA Bindungsmotiv) lokalisierten AP1-Bindungssequenzen mittels einer PCR-basierenden site-directed mutagenesis im 2.9 kb langen Ren-1^C Reportergenkonstrukt (pGL3E-2.9 kb).

Die folgenden Abbildungen zeigen eine schematische Darstellung des proximalen Promotorbereichs mit den beiden putativen AP1-Bindungsstellen und den für die Deletion verwendeten Primern (Abb. 23), sowie eine Übersichtsdarstellung der deletierten Reportergenkonstrukte (Abb. 24).

-183 **AP1 (-147/-141)**

caagtggctctgggggtggagtctggacagcctacattgactgaggccacagaattatgga

3' - CCCCCACCTCAGACCTGTCGGATGT - - - - - ACCGGTGTCTTAATACC - 5'

antisense Primer (AP1 -147/-141)

gctgggtccttggccagaaaacaggctgcctttcatgggtcccacaggccctggggtaataa

TATA-Box **AP1 (-22/-16)** **+1**

atcaaagcagagcctgtgatacatgggtgtgtataaaagaaggctcagggggtctgggcta

3' - CGGACACTATGTACCACACATATTTTCT - - - - - CCCCAGACCCG - 5'

antisense Primer (AP1 -22/-16)

Abb. 23: Schematische Darstellung des proximalen Promotorbereichs mit den zur Deletion verwendeten Primern.

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des proximalen Ren-1^C Promotorbereichs von Position +1 bp bis -183 bp mit den putativen AP1-Bindungsstellen an Position -22/-16 und Position -147/-141 und den zur Mutation verwendeten antisense Primern. Die sense Primer werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

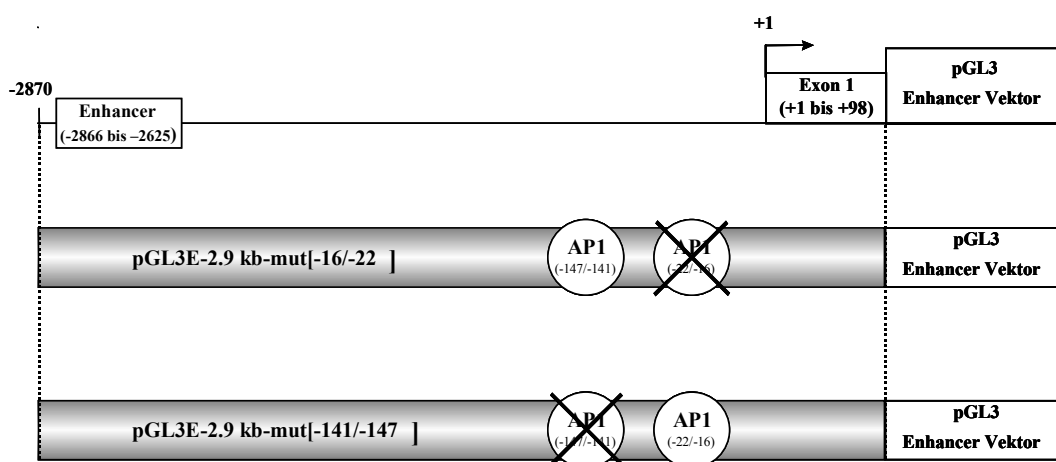


Abb. 24: Schematische Darstellung der deletierten Ren-1^C Reportergenkonstrukte

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der mutierten Ren-1^C Reportergenkonstrukte. Die Konstrukte pGL3E-2.9 kb mut[-16/-22] mit der deletierten AP1-Bindungsstelle an Position -16/-22 und pGL3E-2.9 kb mut[-141/-147] mit der deletierten AP1-Bindungsstelle an Position -147/-141 enthalten einen Bereich von -2870 bis +98 des Ren-1^C Gens, durch den die Expression des Reportergens Luciferase (*Photinus pyralis*) kontrolliert wird.

Weder eine Deletion der AP1-Konsensussequenz an Position -16/-22 noch der AP1-Konsensussequenz an Position -141/-147 führte zu einer Abschwächung bzw. Aufhebung der inhibitorischen Angiotensin II bzw. PMA Wirkung auf die Transkriptionsaktivität der Ren-1^C Reportergenkonstrukte (Abb. 25).

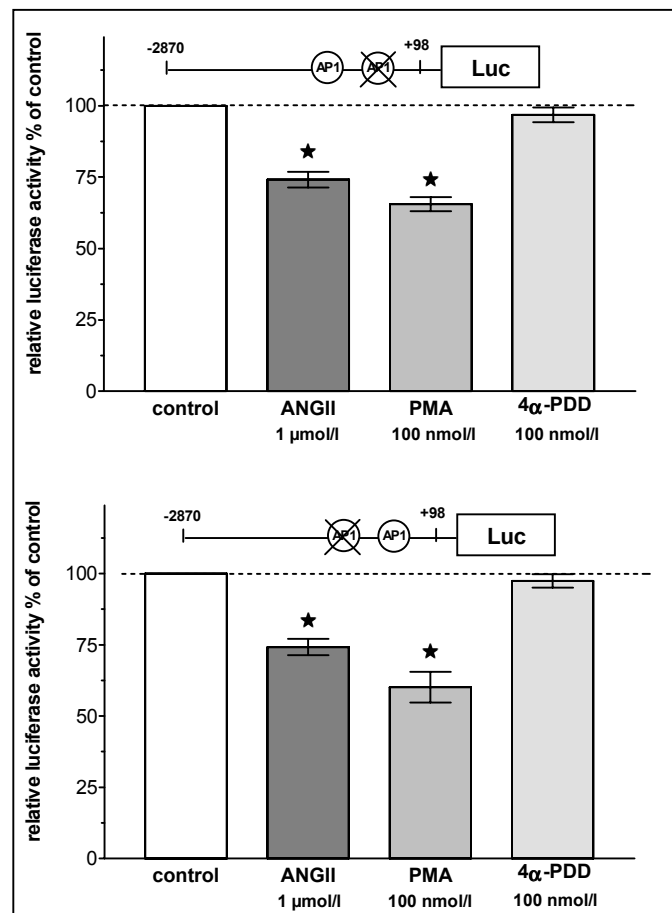


Abb. 25: Wirkung von Angiotensin II (1 µmol/l) und PMA (100 nmol/l) auf die Promotoraktivität der Deletionsmutanten pGL3E-2.9 kb mut[-16/-22] und pGL3E-2.9 kb mut[-141/-147] in As4.1 Zellen (t=16h).

Die mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten Zellen wurden für 16 Stunden mit 1 µmol/l Angiotensin II bzw. 100 nmol/l PMA inkubiert. 4α-PDD diente als interne Kontrolle. Die Luciferaseaktivität (RLU) wurde durch den Backgroundwert korrigiert und ins Verhältnis zur Luciferaseaktivität (RLU) des cotransfizierten pRL-TK Vektors gesetzt. Die Auftragung bezieht sich auf die basale Promotoraktivität der unbehandelten Kontrolle die zu 100 % gesetzt wurde. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen mit jeweils vier unabhängigen Messungen pro Versuch und Bedingung dar. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

1.5 Zusammenfassung

Angiotensin II führt dosis- und zeitabhängig zu einer Suppression der basalen Renin mRNA Abundanz und der Reninsynthese in der juxtaglomerulären Zelllinie As4.1.

Untersuchungen zur Proteinkinase C Aktivität und Experimente mit dem Proteinkinase C Inhibitor Bisindolylmaleimide I (BIM) sowie eine direkte Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) deuten auf eine Beteiligung der Proteinkinase C an der durch Angiotensin II induzierten Hemmung der Reningenexpression und Reninsynthese hin.

Untersuchungen zum Angiotensin II Wirkungsmechanismus zeigten, dass es sich bei der Angiotensin II Wirkung nicht um post-transkriptionelle Regulationsprozesse, sondern eher um einen transkriptionellen Effekt durch Suppression der Ren-1^C Promotoraktivität handelt. Die hierfür verantwortlichen Regulationssequenzen scheinen im Bereich der ersten 2800 Basenpaare des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens lokalisiert zu sein, wobei eine Beteiligung zweier im proximalen Bereich des Reninpromotors liegender AP1-Bindungssequenzen nach den Ergebnissen der Mutationsstudien unwahrscheinlich erscheint.

2. Einfluss von Endothelin 3 auf die Reningenexpression und Reninsynthese in As4.1 Zellen

Im folgenden Abschnitt wurde die Wirkung von Endothelin 3, einem weiteren Vasokonstriktor auf die Reningenexpression und Reninsynthese am Modellsystem der juxtaglomerulären Zelllinie As4.1 untersucht.

2.1 Einfluss von Endothelin 3 auf die Renin mRNA Abundanz

2.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung

Zur Untersuchung der Endothelin 3 Wirkung auf die basale Renin mRNA Abundanz wurde eine Dosis-Wirkungskurve bestimmt. Hierzu erfolgte eine 16-stündige Inkubation mit verschiedenen Endothelin 3 Konzentrationen.

Endothelin 3 bewirkte eine dosisabhängige Abnahme der Renin mRNA Abundanz mit einer signifikanten Inhibierung der Reningenexpression bei 1 nmol/l und einen halbmaximalen Effekt (EC₅₀) bei 10 nmol/l. Eine Dosis von 300 nmol/l zeigte einen maximalen Effekt mit ca. 25 % des Kontrollwerts (Abb. 26).

Endothelin 3 hatte keine Wirkung auf die β -Aktin mRNA Abundanz (Daten nicht gezeigt), so dass β -Aktin als interner Standard verwendet werden konnte und alle folgenden Quantifizierungen der RNase Protection Assays als Renin / β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben werden.

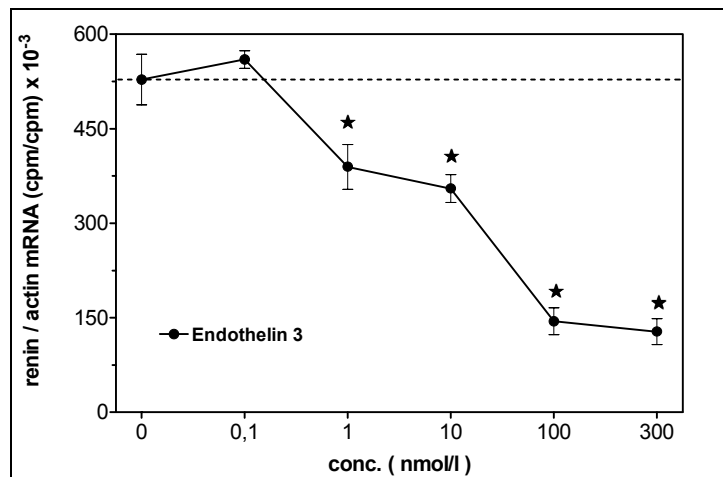


Abb 26: Dosis-Wirkungsbeziehung von Endothelin 3 auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Konzentration dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

2.1.2 Zeitverlauf der Endothelin 3 Wirkung

Zur Bestimmung des Zeitverlaufs der Endothelin 3 Wirkung auf die Renin mRNA Abundanz wurden die Zellen mit 100 nmol/l Endothelin 3 inkubiert und die Renin mRNA Expression nach 0h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16h und 24h ermittelt.

Endothelin 3 bewirkte bereits nach 4 Stunden eine signifikante Abnahme der Renin mRNA Abundanz auf ca. 74 % des Kontrollniveaus und einen maximalen Effekt mit ca. 24 % der Kontrolle nach 24-stündiger Inkubationszeit. Eine halbmaximale Wirkung war nach ca. 8 Stunden erreicht (Abb. 27).

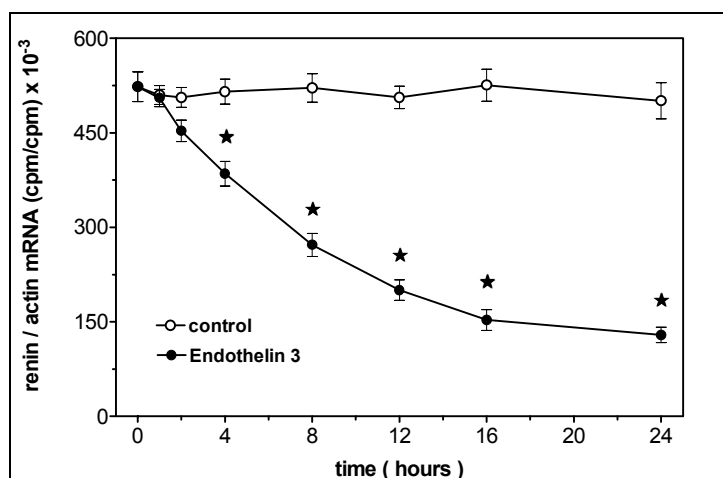


Abb. 27: Zeitverlauf der Endothelin 3 Wirkung (100nmol/l) auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen.

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Zeitpunkt dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

2.2 Signaltransduktion von Endothelin 3

Die Endotheline führen in isolierten JG-Zellen über eine Bindung an den ET_B-Rezeptor zu einer Aktivierung der Phospholipase C, deren Stimulation eine Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP₃ führt zu einem vorübergehenden Anstieg des cytoplasmatischen Kalzium-Spiegels durch Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, wohingegen DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert.

Im folgenden wurde daher die Bedeutung der PKC für die Vermittlung der Endothelin 3 Wirkung auf die Renin mRNA Expression anhand der As4.1 Zellen untersucht.

2.2.1 Messung der Proteinkinase C Aktivität

Zur Untersuchung einer möglichen Stimulation der Proteinkinase C durch Endothelin 3 wurden die Zellen für 16 Stunden mit 100 nmol/l Endothelin 3, 100 nmol/l PMA bzw. 100 nmol/l 4 α -PDD inkubiert und die Proteinkinase C Aktivität bestimmt.

Endothelin 3 führte zu einer signifikanten Aktivierung der Proteinkinase C mit 323 ± 30.3 % der Kontrolle. Der Phorbolester PMA zeigte einen vergleichbaren aktivierenden Effekt mit 357 ± 15.5 % des Kontrollniveaus, wohingegen 4 α -PDD keine signifikante Wirkung auf die Proteinkinase C Aktivität hatte (Abb. 28).

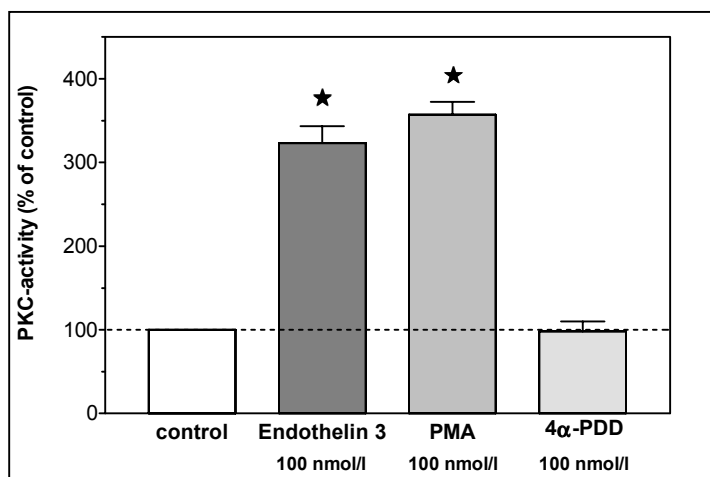


Abb. 28: Proteinkinase C (PKC) Aktivität in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Messung der PKC Aktivität erfolgte mittels eines ELISA Protein Kinase Assay Kits nach 16-stündiger Inkubation mit 100 nmol/l Endothelin 3, 100 nmol/l PMA und 100 nmol/l 4 α -PDD. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM (% der Kontrolle) aus acht Messungen pro Bedingung dar (n=8). ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

2.2.2 Einfluss einer Proteinkinase C Inhibierung auf die Endothelin 3 Wirkung

Zur Abklärung einer möglichen durch Endothelin 3 induzierten Hemmung der Reningenexpression via des Proteinkinase C Signaltransduktionswegs wurde die Proteinkinase C durch den selektiven PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I (BIM) blockiert.

2.2.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung von Bisindolylmaleimide I auf die Endothelin 3 Effekte

Zur Untersuchung einer möglichen dosisabhängigen Wirkung von Bisindolylmaleimide I (BIM) auf die durch Endothelin 3 induzierte Suppression der Renin mRNA Expression erfolgte eine 16-stündige Inkubation der Zellen mit Endothelin 3 (100 nmol/l) bzw. mit einer Kombination von Endothelin 3 (100 nmol/l) und verschiedenen Bisindolylmaleimide I Konzentrationen (100 nmol/l, 300 nmol/l, 1 μ mol/l).

Endothelin 3 führte zu einer Abnahme der Renin mRNA Abundanz auf ca. 47 % des Kontrollniveaus. Diese inhibitorische Wirkung konnte von 300 nmol/l Bisindolylmaleimide I signifikant abgeschwächt werden. 1 μ mol/l Bisindolylmaleimide I bewirkte eine maximale Abschwächung der Endothelin 3 Wirkung mit ca. 88 % der Kontrolle im Vergleich zur Endothelin Wirkung mit 47 % des Kontrollniveaus (Abb. 29).

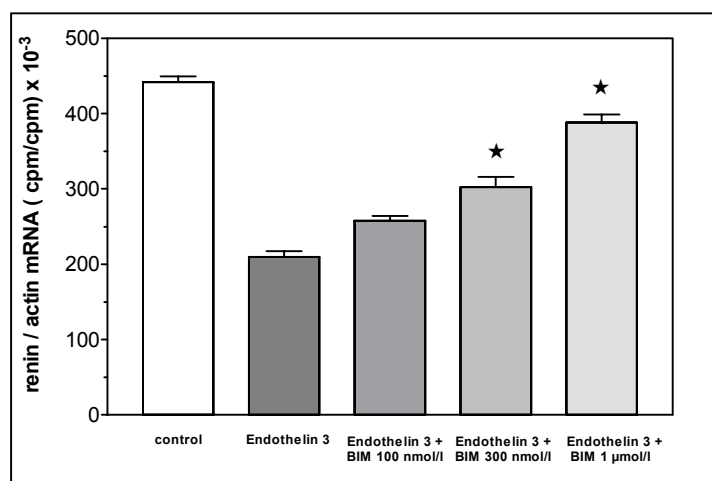


Abb. 29: Effekte von Endothelin 3 (100 nmol/l) und Endothelin 3 (100 nmol/l) in Kombination mit verschiedenen Bisindolylmaleimide I Konzentrationen auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus sechs Messungen pro Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 μ g (Renin) bzw. 1 μ g (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Endothelin 3 Behandlung.

2.2.2.2 Zeitverlauf der Bisindolylmaleimide I Wirkung auf die Endothelin 3 Effekte

Im weiteren wurde der Zeitverlauf der Endothelin 3 Wirkung (100 nmol/l) und einer Kombination von 100 nmol/l Endothelin 3 mit 1 µmol/l Bisindolylmaleimide I auf die Renin mRNA Abundanz untersucht.

Endothelin 3 führte wie bereits unter Punkt 2.1.2 dargestellt zu einer zeitabhängigen Inhibierung der Renin mRNA Expression. Dieser inhibitorische Effekt konnte bei einer Kombination von Endothelin 3 mit Bisindolylmaleimide I nach 8 Stunden bis zum Ende der Versuchsreihe nach 16 Stunden signifikant abgeschwächt werden (Abb. 30).

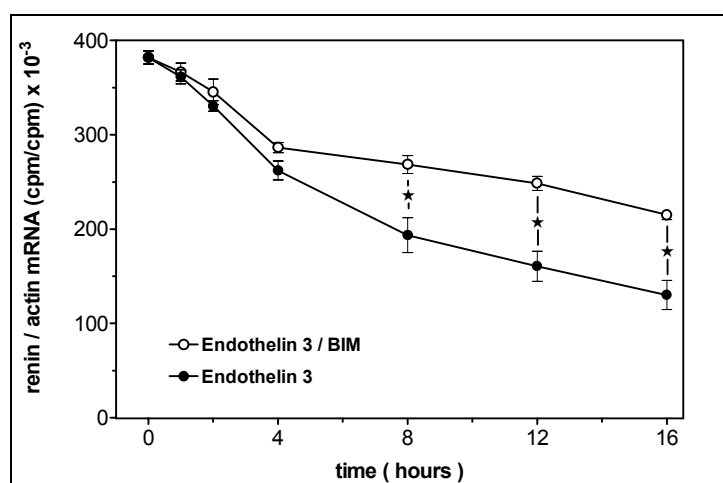


Abb. 30: Zeitverlauf der Endothelin 3 (100 nmol/l) Wirkung und einer Kombination von Endothelin 3 (100 nmol/l) mit Bisindolylmaleimide I (1 µmol/l) auf die Renin mRNA Expression in As4.1 Zellen.

Die Werte werden als Renin/β-Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte ± SEM aus sechs Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar (n=6). Es wurden 10 µg (Renin) bzw. 1 µg (β-Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt. ★p<0.05 vs. Endothelin 3 Behandlung.

2.3 Einfluss von Endothelin 3 auf die Reninsynthese

Durch Bestimmung der Gesamtreninaktivität wurde der Einfluss von Endothelin 3 und einer direkten Aktivierung der PKC auf den Reningehalt und somit auf die Reninsynthese ermittelt.

Endothelin 3 (100 nmol/l) führte zu einer Abnahme der basalen Reninaktivität von 15.16 ± 0.75 ngANGI/h/100µl auf 9.53 ± 0.63 ngANGI/h/100µl, was einer Abnahme auf ca. 63 % des Kontrollniveaus entsprach. Bei 100 nmol/l PMA wurde eine ähnliche Reduktion der Reninaktivität auf 7.57 ± 0.41 ngANGI/h/100µl (ca. 50 % der Kontrolle) gemessen, wohingegen 4α-PDD keine Wirkung auf die Reninaktivität hatte (Abb. 31).

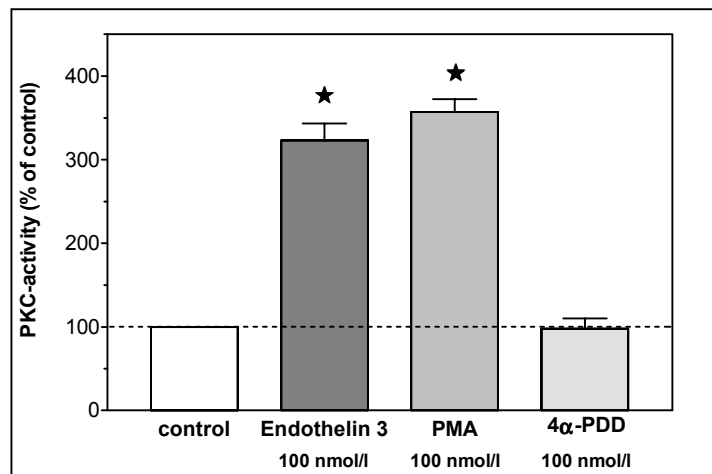


Abb. 31: Effekte von Endothelin 3 (100 nmol/l), PMA (100 nmol/l) und α -PDD (100 nmol/l) auf die Gesamtreninaktivität (ng ANGI/h/100 μ l) in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die Zellen wurden nach 16-stündiger Inkubationszeit isoliert und die Reninaktivität nach Aktivierung von intrazellulärem bzw. sezerniertem Prorenin in aktives Renin durch Trypsinbehandlung anhand eines ANG I Radioimmuno Assays bestimmt. Die Werte werden als (ngANGI/h/100 μ l) angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen mit jeweils vier unabhängigen Messungen pro Bedingung und Experiment dar.

★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

2.4 Wirkungsmechanismus von Endothelin 3

2.4.1 Einfluss von Endothelin 3 auf die Renin mRNA Stabilität

Zur Bestimmung möglicher post-transkriptioneller Effekte von Endothelin 3 auf die Renin mRNA Abundanz erfolgte eine Blockade transkriptioneller Prozesse durch Actinomycin D, einem potenten Inhibitor der RNA-Polymerase II.

Die Zellen wurden parallel entweder mit 100 nmol/l Endothelin 3 in Gegenwart von Actinomycin D (10 μ g/ml) oder ausschließlich mit Actinomycin D behandelt und die Kinetik der Renin mRNA Abundanz nach 0h, 4h, 8h, 12h und 16h bestimmt.

Endothelin 3 hatte keinen Einfluss auf den Zeitverlauf der Renin mRNA Abundanz nach Blockade der Transkription. Die Renin mRNA Halbwertszeit lag sowohl bei Actinomycin D als auch bei der Kombination Actinomycin D/Endothelin 3 bei ca. 9 Stunden (Abb. 32). Endothelin 3 scheint somit keinen Einfluss auf die Renin mRNA Stabilität zu bewirken, so dass die Abnahme der Renin mRNA Abundanz nach Inkubation mit Endothelin 3 nicht durch eine erhöhte Abbaurate der Renin mRNA erklärt werden kann.

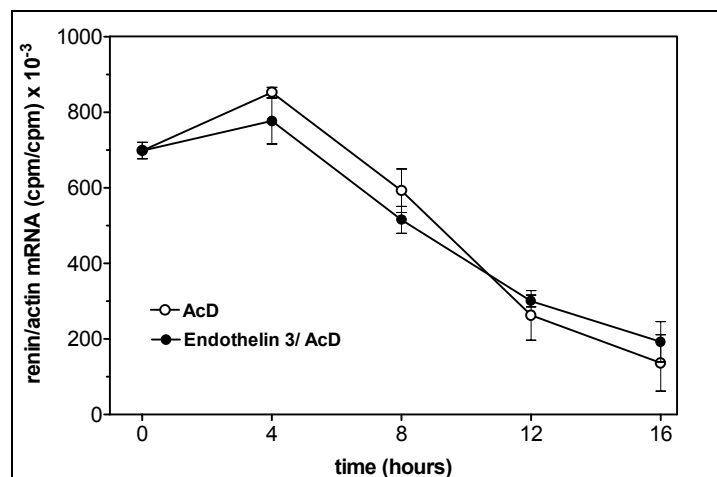


Abb. 32: Effekte von Endothelin 3 (100 nmol/l) auf die Renin mRNA Halbwertszeit nach Blockade der Transkription durch Actinomycin D (AcD: 10 µg/ml).

Die Werte werden als Renin/ β -Aktin mRNA (cpm/cpm) Ratio angegeben und stellen Mittelwerte \pm SEM aus vier Messungen pro Zeitpunkt und Bedingung dar (n=4). Es wurden 10 µg (Renin) bzw. 1 µg (β -Aktin) Total-RNA pro Messung eingesetzt.

2.4.2 Transkriptionelle Regulationsmechanismen

Nachdem Endothelin 3 keinen Einfluss auf die Renin mRNA Stabilität hatte, wurde anhand von Promotorstudien eine mögliche transkriptionelle Regulation untersucht.

2.4.2.1 Promotorstudien

Zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität wurden die Zellen mit den bereits unter Punkt 1.4.2.1 beschriebenen Reportergenkonstrukten des Ren-1^C Promotors (pGL3E-4.2 kb und pGL3E-2.9 kb) transfiziert. Eine 16-stündige Inkubation der transfizierten Zellen mit 100 nmol/l Endothelin 3, 100 nmol/l PMA bzw. 100 nmol/l 4 α -PDD führte zu einer signifikanten Reduktion der Promotoraktivität sowohl des pGL3E-4.2 kb Konstrukts auf 71 ± 3 % als auch des pGL3E-2.9 kb Konstrukts auf 69 ± 4 % der Kontrolle bei Stimulation durch Endothelin 3. Der Phorbolester PMA zeigte ebenfalls eine Suppression der Promotoraktivität sowohl des pGL3E-4.2 kb Konstrukts (53 ± 6 %) als auch des pGL3E-2.9 kb Konstrukts (61 ± 2 %). 4 α -PDD hatte bei beiden Konstrukten keine signifikante Wirkung (Abb. 33).

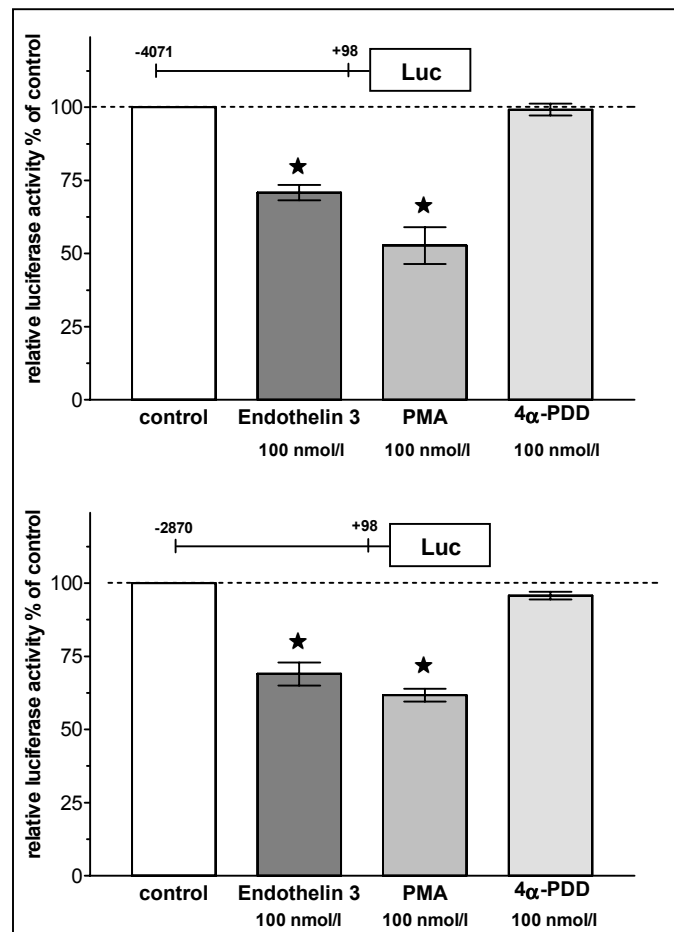


Abb. 33: Wirkung von Endothelin 3 (100 nmol/l) und PMA (100 nmol/l) auf die Promotoraktivität der Ren-1^C Promotor Reportergenkonstrukte pGL3E-4.2 kb bzw. pGL3E-2.9 kb in As4.1 Zellen (t= 16h).

Die mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten Zellen wurden für 16 Stunden mit 100 nmol/l Endothelin 3 bzw. 100 nmol/l PMA inkubiert. 4α-PDD diente als interne Kontrolle. Die Luciferaseaktivität (RLU) wurde durch den Backgroundwert korrigiert und ins Verhältnis zur Luciferaseaktivität (RLU) des cotransfizierten pRL-TK Vektors gesetzt. Die Auftragung bezieht sich auf die basale Promotoraktivität der unbehandelten Kontrolle die zu 100 % gesetzt wurde. Die Werte stellen Mittelwerte ± SEM aus drei Versuchen mit jeweils vier unabhängigen Messungen pro Versuch und Bedingung dar. ★p<0.05 vs. Kontrollbedingung.

2.4.2.2 Deletionsstudien

Da die vorliegenden Daten ebenso wie bei Angiotensin II auf eine Beteiligung des Proteinkinase C Signaltransduktionswegs hindeuteten, wurde anhand von Deletionsstudien eine Beteiligung der beiden im proximalen Promotorbereich liegenden AP1-Konsensussequenzen abgeklärt.

Auch hier führte eine Deletion der beiden putativen AP1-Bindungsstellen zu keiner signifikanten Abschwächung der Endothelin 3 Wirkung auf die Ren-1^C Promotoraktivität (Abb. 34).

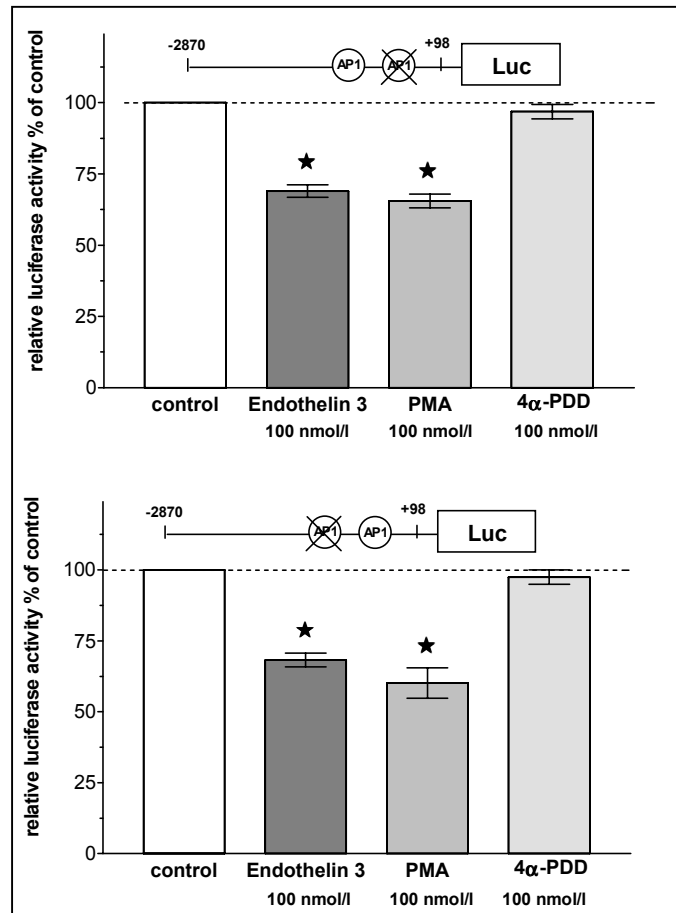


Abb. 34: Wirkung von Endothelin 3 (100 nmol/l) und PMA (100 nmol/l) auf die Promotoraktivität der Deletionsmutanten pGL3E-2.9 kb mut[-16/-22] und pGL3-2.9E kb mut[-141/-147] in As4.1 Zellen (t=16 h).

Die mit den jeweiligen Konstrukten transfizierten Zellen wurden für 16 Stunden mit 100 nmol/l Endothelin 3 bzw. 100 nmol/l PMA inkubiert. 4α-PDD diente als interne Kontrolle. Die Luciferaseaktivität (RLU) wurde durch den Backgroundwert korrigiert und ins Verhältnis zur Luciferaseaktivität (RLU) des cotransfizierten pRL-TK Vektors gesetzt. Die Auftragung bezieht sich auf die basale Promotoraktivität der unbehandelten Kontrolle die zu 100 % gesetzt wurde. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen mit jeweils vier unabhängigen Messungen pro Versuch und Bedingung dar. ★ $p < 0.05$ vs. Kontrollbedingung.

2.5 Zusammenfassung

Endothelin 3 führt dosis- und zeitabhängig zu einer Abnahme der basalen Renin mRNA Abundanz und der Reninsynthese in As4.1 Zellen.

Die Ergebnisse zur Endothelin 3 Signaltransduktion deuten auf eine Beteiligung der Proteinkinase C an der durch Endothelin 3 induzierten Suppression der Reningenexpression und Reninsynthese hin.

Diese Suppression wird nicht durch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen gesteuert, sondern findet auf transkriptioneller Ebene durch Inhibierung der Ren-1^C Promotoraktivität statt. Die hieran beteiligten inhibitorischen Regulationssequenzen scheinen im Bereich der ersten 2.8 kb des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens lokalisiert zu sein.

IV. Diskussion

Das Renin-Angiotensin System (RAS) spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutdrucks und der Homöostase des Wasser- und Elektrolythaushalts. Die Aktivität des RAS ist abhängig von der Aspartylprotease Renin, dessen Konzentration unter physiologischen Bedingungen limitierend ist. Das in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen (JG-Zellen) produzierte Renin spaltet im ersten Schritt der Reaktionskaskade aus dem α -Globulin Angiotensinogen (ANG-0) das Decapeptid Angiotensin I (ANGI) ab. Angiotensin I ist biologisch inaktiv und wird durch das ubiquitäre, endothelständige Angiotensin Converting Enzym (ACE) um 2 Aminosäuren verkürzt und so zu Angiotensin II (ANGII) umgewandelt, dem biologischen Effektor des Systems.

Angiotensin II wirkt stark vasokonstriktorisch und stimuliert in der Nebenniere die Synthese und Freisetzung von Aldosteron, das in der Niere zu einer verstärkten Wasser- und Na^+ -Retention führt und dadurch eine Erhöhung des Extrazellulärvolumens bewirkt.

Angiotensin II beeinflusst in vivo eine Reihe von physiologischen Parametern, die selbst direkte Regulatoren des RAS darstellen, wie z.B. den intrarenalen Blutdruck (Hackenthal et al, 1990), die NaCl-Homöostase (Hackenthal et al, 1990) sowie die Sympathikusaktivität (Holmer et al, 1993) und reguliert dadurch indirekt über einen negativen Feedbackmechanismus die Reningenexpression und Reninsekretion und somit die RAS-Aktivität.

Zusätzlich scheint Angiotensin II auch direkt über einen negativen, sogenannten „short loop“ Feedbackmechanismus auf die Reningenexpression und Reninsekretion zu wirken.

So führte eine ANGI Infusion in Hunden (Vander and Geelhoed, 1965) zu einer Hemmung der Reninsekretion. Schunkert et al. konnten zusätzlich zeigen, dass eine direkte Gabe von ANGI nicht nur die Reninsekretion sondern auch die Reningenexpression signifikant supprimiert (Schunkert et al., 1992). Eine ANGI-Rezeptorblockade mit kompetitiven Antagonisten wie Saralasin (Davis et al., 1976; Johnson et al., 1973; Ayers et al., 1974, McDonald et al., 1975) bzw. Untersuchungen mit ACE-Hemmern (Nakamura et al., 1985) zeigten sowohl eine Stimulation der Reninsekretion als auch der Reningenexpression.

Bei Untersuchungen an in vitro Modellen hatte ANGI ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf die Reninsekretion. Es konnte gezeigt werden, dass ANGI an isoliert

perfundierten Nieren (Vandongen et al., 1974) zu einer Hemmung der Reninsekretion führt. Auf Ebene der JG-Zellen bewirkte ANGII (Khayat et al., 1981, Pinet et al., 1987, Kurtz et al., 1991) eine Hemmung der Reninsekretion, wohingegen eine Blockade von ANGII-AT1 Rezeptoren (Ichihara et al., 1995) die Reninfreisetzung stimulierte. Andererseits wiederlegten Untersuchungen an Angiotensin AT1-Rezeptor knockout-Mäusen (Matsusaka et al., 1996) eine direkte Wirkung von Angiotensin II über den AT1-Rezeptor und somit auch das Konzept einer direkten Hemmung der Reningenexpression durch Angiotensin II über einen „short loop“ Feedbackmechanismus. So wurde eine Angiotensin II Wirkung durch Prostaglandine über eine Regulation der Cyclooxygenase-2 Expression postuliert (Cheng et al., 1999). Ausgehend von diesen Daten ist es daher bis dato unklar, ob ANGII die Reningenexpression und Reninsynthese direkt auf Ebene der JG-Zellen kontrolliert und welche Signaltransduktionswege daran beteiligt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein möglicher direkter zellulärer Effekt von ANGII auf die Reningenexpression und Reninsynthese anhand der juxtaglomerulären Zelllinie As4.1 untersucht. Diese Zelllinie wurde von Sigmund et al. (1990) durch transgene Tumorgenese aus einem Nierentumor der Maus isoliert. Die Transformation erfolgte durch ein SV40 T-Antigen, das unter der Kontrolle des Ren-2 Promotors steht. Die As4.1 Zellen weisen eine hohe basale Expression des endogenen Ren-1^C Gens auf und verfügen über Eigenschaften wie Speicherung und regulierte Sekretion von enzymatisch aktivem Renin (Sigmund et al., 1990), die normalerweise charakteristisch für JG-Zellen sind. Zusätzlich exprimieren die As4.1 Zellen (Burson et al., 1994) ebenso wie die juxtaglomerulären Epitheloidzellen (Gasc et al., 1993) den für die ANGII Wirkung verantwortlichen AT1 Rezeptor, so dass sie ein ideales Modellsystem zur Charakterisierung der molekularen ANGII Effekte auf die Reningenexpression und Reninsynthese darstellen.

Angiotensin II führte in der vorliegenden Arbeit zu einer dosis- ($EC_{50}=100$ nmol/l) und zeitabhängigen Abnahme der Renin mRNA Abundanz (Abb.7 und 8). Somit scheint ANGII wie bereits in früheren in vivo Arbeiten postuliert (Johns et al., 1990; Schrick et al., 1997) direkt über einen negativen Rückkopplungsmechanismus eine Hemmung der Reningenexpression auf zellulärer Ebene zu vermitteln.

Da ANGII in As4.1 Zellen eine Verdreifachung der Proteinkinase C Aktivität bewirkte (Abb. 9) und in JG-Zellen bereits Hinweise auf eine PKC induzierte Hemmung der cAMP

stimulierten Reningenexpression und Reninsynthese vorliegen (Ritthaler et al., 1995; 1996), könnte die Hemmung der Reningenexpression im As4.1 Zellsystem durch ANGII mittels einer durch die Phospholipase C gesteuerten Aktivierung der Proteinkinase C bedingt sein. ANGII führt z.B. in isolierten JG-Zellen (Kurtz et al. 1990) und verschiedenen weiteren Zelltypen über eine Bindung an den AT1-Rezeptor zu einer Aktivierung der Phospholipase C und somit zu einer Spaltung von Phosphoinositolbisphosphat in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 steuert die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert.

Es zeigte sich, dass der selektive PKC Inhibitor Bisindolylmaleimide I (Toullec et al., 1991) der selbst keine Wirkung auf die basale Renin mRNA Abundanz hatte (Abb.10) die Hemmung der Reningenexpression durch ANGII abschwächen konnte (Abb.11 und 12). Da der Phorbolester Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), ein direkter Aktivator der PKC, eine zur ANGII Wirkung vergleichbare dosis- ($EC_{50}=10$ nmol/l) und zeitabhängige Hemmung der Reningenexpression aufwies (Abb.13 und 14), erscheint eine maßgebliche Beteiligung der PKC an der Suppression der Renin mRNA Expression möglich.

Die Blockade der PKC konnte jedoch die Hemmung der Reningenexpression nur abschwächen und nicht vollständig aufheben (Abb.11 und 12), so dass noch weitere inhibitorisch wirkende Mechanismen z.B. eine durch IP_3 induzierte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration an der Suppression der Reningenexpression beteiligt sein könnten. So führte in nativen JG-Zellen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer Hemmung der Reningenexpression (DellaBruna et al., 1995).

Dieser durch die PKC vermittelte inhibitorische Effekt war nicht nur auf die Reningenexpression beschränkt, sondern zeigte auch eine Hemmung der Reninsynthese (Abb.17). ANGII bewirkt somit sehr wahrscheinlich über eine verminderte Renin mRNA Expression die Hemmung der Reninsynthese.

Die Änderung der Renin mRNA Abundanz durch ANGII bzw. PMA könnte sowohl durch eine veränderte Renin mRNA Stabilität als auch durch eine Hemmung der Transkription oder von einer Kombination beider Mechanismen gesteuert werden. Untersuchungen an isolierten JG-Zellen (Chen et al., 1993) und humanen Calu6 Lungenkarzinom Zellen (Lang et al., 1996; Sinn et al., 1999) ergaben, dass die Stimulation der Reningenexpression durch

cAMP sowohl durch eine minimale Stimulation der Transkriptionsaktivität über ein cAMP response-element (Nakamura et al., 1989; Horiuchi et al., 1991) als auch durch eine Zunahme der Renin mRNA Stabilität (Verdreifachung der Renin mRNA Stabilität) erfolgt. Zur Abklärung einer möglichen post-transkriptionellen Regulation der Renin mRNA Abundanz wurde die Kinetik der Renin mRNA Abundanz nach Blockade der Transkription durch Actinomycin D, einem potenten Hemmer der RNA-Polymerase II, in Gegenwart und Abwesenheit von ANG II bzw. PMA bestimmt.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte ANGII (Abb.18) bzw. PMA (Abb.19) keinen Einfluss auf den Zeitverlauf der Renin mRNA Abundanz nach Blockade der Transkription. Die Renin mRNA Halbwertszeit lag jeweils in Gegenwart von ANGII bzw. PMA bei ca. 9 Stunden (Abb.18 und 19). Obwohl eine Interpretation dieser Versuche dadurch erschwert ist, dass eine generelle Blockade der Gentranskription nicht nur zu einer Hemmung der Renin mRNA *de novo* Synthese, sondern auch zu einer Hemmung der Transkription von möglicherweise für die ANGII bzw. PMA Wirkung wichtigen Zielproteinen führt, scheint die Aktivierung der Proteinkinase C durch ANGII bzw. PMA keinen Einfluss auf die Renin mRNA Stabilität zu vermitteln, so dass die Abnahme der Renin mRNA Abundanz nicht durch eine gesteigerte Abbaurate der mRNA erklärt werden kann.

Nachdem sich keine Hinweise auf eine post-transkriptionelle Regulation der Renin mRNA Abundanz ergaben, wurde eine mögliche transkriptionelle Regulation durch Promotorstudien abgeklärt. Hierzu wurden zwei Luciferase-Reportergenkonstrukte mit Fragmenten von 4.2 kb bzw. 2.9 kb Länge des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens hergestellt und die Promotoraktivität nach Transfektion und Aktivierung der PKC durch ANGII bzw. PMA bestimmt. Die Auswahl der Promotorfragmente erfolgte aufgrund von Promotorstudien des Ren-1^C Promotors in As4.1 Zellen (Petrovic et al., 1996). Petrovic et al. hatten bereits die Funktionalität eines 4.2 kb bzw. 2.9 kb langen Abschnitts des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens anhand von Promotorstudien nachweisen können. Kürzere Abschnitte zeigten aufgrund eines im Bereich zwischen Position -2866 bis -2625 bp lokalisierten Enhancers nur noch geringe Transkriptionsaktivitäten.

Zur Etablierung eines Transfektionsprotokolls wurden verschiedene kationische, liposomale Transfektionsmittel bezüglich ihrer Transfektionseffizienz und Cytotoxizität für das vorliegende As4.1 Zellsystem charakterisiert (Abb. 21). Das Transfektionsreagenz FugeneTM6 zeigte mit Abstand die höchste Transfektionseffizienz der getesteten

Reagenzien und wies gleichzeitig im Gegensatz zu den Transfektionsreagenzien Superfect und DOTAP eine nur geringe Cytotoxizität für das Zellsystem auf und wurde daher zur Transfektion der Reportergenkonstrukte verwendet. Zur Messung der Ren-1^C Promotoraktivität wurde ein Dual-Luciferase Assay System verwendet, da mit diesem System reproduzierbare Ergebnisse durch gleichzeitige Messung sowohl der durch die Ren-1^C Promotoraktivität determinierten *Photinus pyralis* Luciferase als auch der zur Standardisierung der Transfektionsbedingungen cotransfizierten *Renilla reniformis* Luciferase (pRL-TK Vektor) erzielt wurden.

Die Untersuchungen der Ren-1^C Promotoraktivität ergaben, dass die Aktivierung der PKC durch ANGII bzw. PMA sowohl eine Abnahme der Promotoraktivität des 4.2 kb als auch des 2.9 kb Fragments des Ren1^C Promotors bewirkten (Abb.22). Die für die Hemmung der Promotoraktivität durch ANGII bzw. PMA verantwortlichen regulatorischen Sequenzen dürften demnach im Bereich der ersten 2.9 kb des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens lokalisiert sein. ANGII führt somit über eine Suppression der Transkription zu einer Abnahme der Reningenexpression und infolge zu einer Hemmung der Reninsynthese.

Die Diskrepanz zwischen der Abnahme der Renin mRNA Abundanz auf ca. 36 % der Kontrolle und der eher moderaten Hemmung der Ren-1^C Promotoraktivität (ca. 74 % der Kontrolle) dürfte aus den unterschiedlichen Meßmethoden resultieren. So unterliegt die im Protection Assay gemessene Renin mRNA nicht nur dem Einfluss von ANGII sondern auch noch dem ANGII-unabhängigen Abbau durch intrazelluläre RNasen (mRNA-Halbwertszeit ca. 9 Stunden; siehe Abb.18) Im Gegensatz dazu wird bei der Bestimmung der Promotoraktivität die Enzymaktivität des Luciferaseproteins gemessen, dessen mRNA durch ein Polyadenylierungssignal gegenüber einem Abbau durch intrazelluläre RNase geschützt ist. Zusätzlich unterscheidet sich die Abbaurate des Luciferaseproteins wesentlich von der einer mRNA.

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse so erscheint es wahrscheinlich, dass ANGII im wesentlichen über eine PKC induzierte Hemmung der Ren-1^C Promotoraktivität die Renin mRNA Abundanz und Reninsynthese supprimiert. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen in stabil mit AT1 Rezeptoren transfizierten Y1 Zellen (adrenocorticale Tumorzelllinie), bei denen sowohl ANGII als auch PMA zu einer dosisabhängigen Hemmung der Reningenexpression und der Promotoraktivität des humanen Reninpromotors führten (Chen et al., 1998).

Ausgehend von dieser PKC-abhängigen Hemmung der Reningenexpression in As4.1 Zellen kann man eine generelle Bedeutung der PKC für die Hemmung der Reningenexpression bei Phospholipase C aktivierenden Hormonen und parakrinen Faktoren postulieren.

Diese Hypothese steht im Einklang mit früheren in vitro Untersuchungen an isolierten nativen JG-Zellen, bei denen die Endotheline über eine Aktivierung der Phospholipase C ebenfalls eine PKC-abhängige Suppression der Reningenexpression und Reninsynthese zeigten (Ritthaler et al., 1995; 1996). Die Endotheline hatten zwar keinen Einfluss auf die basale Reningenexpression, jedoch konnte die cAMP induzierte Stimulation der Reningenexpression durch Endotheline signifikant abgeschwächt werden. Dieses Ergebnis könnte durch die verwendete Meßmethode erklärt werden. So konnte die basale Renin mRNA Abundanz nur nach 35 Zyklen mit der PCR-Methode nachgewiesen werden, so dass eine mögliche Endothelin gesteuerte Hemmung der basalen Reningenexpression aufgrund der Nachweisgrenze der PCR nicht mehr detektierbar war. Andererseits wäre es auch denkbar, dass es sich bei der in den JG-Zellen auftretenden geringen basalen Reningenexpression um einen für die Aufrechterhaltung der JG-Zellfunktion nötigen Ausgangszustand handelt, der durch die Endotheline nicht weiter reduziert werden konnte.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstreichen eine generelle Bedeutung der PKC für die Regulation der Reningenexpression. So führte Endothelin 3 sowohl zu einer zur ANGII Wirkung vergleichbaren Aktivierung der PKC (Abb.28) als auch zu einer dosis- (EC_{50} 10 nmol/l) und zeitabhängigen Abnahme der Renin mRNA Abundanz (Abb. 26 und 27). Die Hemmung der Reningenexpression konnte ebenso wie bei ANGII bzw. PMA durch Bisindolylmaleimide I, einem selektiven PKC-Inhibitor signifikant abgeschwächt werden (Abb. 29 und 30). Da der Endothelin 3 Effekt durch eine Blockade der PKC abgeschwächt wurde, erscheint eine maßgebliche Beteiligung der PKC an der Hemmung der Reningenexpression durch Endothelin 3 möglich. Jedoch konnte der Endothelin 3 Effekt nur abgeschwächt und nicht vollständig aufgehoben werden, so dass eine weitere Beteiligung von inhibitorisch wirkenden Mechanismen denkbar ist. So führt Endothelin 3 über die Phospholipase C nicht nur zu einer Aktivierung der PKC durch DAG sondern auch zur Bildung von IP_3 und infolge zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration, die wie bereits in nativen JG-Zellen gezeigt (DellaBruna et al., 1995) zu einer Hemmung der Reningenexpression führen könnte.

Die Untersuchungen des Endothelin 3 Wirkungsmechanismus deuten auf eine transkriptionelle Regulation der Reningenexpression hin. So zeigte Endothelin 3 keinen Einfluss auf den Zeitverlauf der Renin mRNA Abundanz nach Blockade der Transkription durch Actinomycin D (Abb. 32), so dass eine Regulation der Renin mRNA Abundanz durch eine veränderte Renin mRNA Stabilität unwahrscheinlich erscheint.

Endothelin 3 führte jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Ren-1^C Promotoraktivität (Abb. 33), so dass Endothelin 3 über die Suppression der Transkriptionsaktivität eine Abnahme der Renin mRNA Abundanz und in folge eine Hemmung der Reninsynthese bewirkt. Die für die Endothelin 3 Wirkung verantwortlichen regulatorischen Sequenzen scheinen im Bereich der ersten 2900 Basenpaare des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens lokalisiert zu sein. Endothelin 3 führt also ebenso wie ANGII über eine PKC induzierte Hemmung der Transkription zu einer Abnahme der Renin mRNA Abundanz und Reninsynthese (Abb.31).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Phospholipase C aktivierende Hormone und parakrine Faktoren über den PKC Signaltransduktionsweg eine Hemmung der Reningenexpression bewirken.

Die Regulation der Reningenexpression durch die PKC scheint jedoch gewebespezifisch gesteuert zu sein. Im Gegensatz zu ihrem in nativen JG-Zellen (Ritthaler et al., 1995; 1996) und in der hier vorliegenden Arbeit bereits nachgewiesenem inhibitorischen Effekt auf die Reningenexpression, scheint die PKC in Chorion- und Decidua Zellen einen gegensätzlichen Effekt zu vermitteln. So wurde in Chorion Zellen (Caroff et al., 1993) und Decidua Zellen (Chao et al., 1993) eine Zunahme der Renin mRNA Abundanz durch Endotheline beschrieben. Zusätzlich führte in Chorion Zellen eine direkte Aktivierung der PKC durch PMA zu einer Steigerung der humanen Reninpromotoraktivität (Borensztein et al., 1994). Der genaue Mechanismus dieser durch die PKC induzierten gewebespezifischen Regulation der Reningentranskription bleibt noch aufzuklären.

Da es sich bei der PKC Familie um ein Enzym mit wenigstens 11 verschiedenen Subtypen handelt, gilt es in weiteren Untersuchungen die für die Regulation der Reningenexpression in AS4.1 Zellen essentielle Isoform anhand von Western-Blots und Aktivitätstests zu charakterisieren.

Das vorliegende Ergebnis mit einer dreifachen Steigerung der PKC-Aktivität nach 16-stündiger Inkubation mit ANGII bzw. PMA, das im Gegensatz zum bekannten Effekt des PKC-Abbaus und der damit verbundenen Abnahme der PKC Aktivität nach

Langzeitbehandlung mit Phorbolestern bzw. physiologischen Agonisten steht, könnte möglicherweise durch eine Isoenzym selektive Regulation der PKC-Subtypen in As4.1 Zellen erklärt werden.

Die Hemmung der Ren-1^C Promotoraktivität könnte möglicherweise durch eine PKC induzierte Bildung des Transkriptionsfaktors AP1 erklärt werden. So führt die PKC durch eine über die c-Jun Phosphatase katalysierten Reaktion zur Dephosphorylierung der carboxy-terminalen Phosphorylierungsseite des c-Jun Proteins (Thr 231, 239 und Ser 249) (Lin et al., 1992) und in folge zur Bildung des Transkriptionsfaktors AP1. Zur Abklärung dieser Annahme erfolgte die Deletion von zwei im proximalen Promotorbereich des Ren-1^C Gens lokalisierter AP1-Bindungsstellen, die bereits in HEK Zellen (human embryonic kidney cells) im Zusammenhang mit einer c-Jun regulierten Reningenexpression diskutiert wurden (Tamura et al., 1998).

Da weder eine Deletion der an Position –16 bis –22 bp noch der an Position –141 bis –147 bp lokalisierten AP1-Bindungsstelle die PKC induzierte Hemmung der Promotoraktivität signifikant vermindern konnte (Abb. 25 und 34), erscheint eine Beteiligung dieser AP1-Bindungssequenzen unwahrscheinlich. Ein rechnergestützter Datenbank-Vergleich mit dem Analyseprogramm Transfac (GGF-Braunschweig) konnte jedoch die Existenz weiterer im Bereich der ersten 2900 bp des Ren-1^C Promotors lokalisierter AP1-Bindungsstellen nachweisen, so dass eine mögliche Regulationswirkung dieser Sequenzen im Zuge weiterführender Promotorstudien anhand von Deletionsstudien und EMSA (electrophoretic mobility shift assay) Untersuchungen abgeklärt werden muss.

Andererseits gibt es auch Hinweise auf eine Regulation der Ren-1^C Promotoraktivität durch den Transkriptionsfaktor NFkappaB, der ebenfalls durch die PKC aktiviert werden kann. So konnte in unserem Labor gezeigt werden, das TNF α ein bekannter Stimulator des IKK/NFkappaB Signaltransduktionswegs sowohl zu einer Hemmung der Ren-1^C Promotoraktivität als auch dosisabhängigen Abnahme der Renin mRNA Abundanz führt (unveröffentlichte Daten von Herrn Dr. Todorov). Dieser Effekt scheint jedoch PKC unabhängig zu sein, da eine direkte Blockade der PKC durch Bisindolylmaleimide I keine Wirkung auf die Abnahme der Renin mRNA Abundanz hatte. Andererseits führte eine direkte Aktivierung der PKC durch PMA zu keiner additiven Wirkung von TNF α . Ausgehend von diesen Daten könnte man also eine gemeinsame Regulation der Reningenexpression über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkappaB

postulieren. Zur Verifizierung dieser Annahme müssen jedoch noch weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass ANGII bzw. Endothelin 3 über eine PKC induzierte Hemmung der Ren-1^C Promotoraktivität zu einer Abnahme der Renin mRNA Abundanz und Reninsynthese führt. Die für die Suppression der Promotoraktivität verantwortlichen regulatorischen Sequenzen dürften im Bereich der ersten 2900 bp des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens lokalisiert sein.

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen potentiellen direkten Effekt von vasokonstriktorisches Hormonen auf die Reningenexpression am Beispiel von Angiotensin II und Endothelin 3 in der juxtaglomerulären Zelllinie As4.1 zu untersuchen und die beteiligten Signaltransduktionswege und Wirkungsweisen der Hormone näher zu charakterisieren.

Die Ergebnisse zeigten, dass Angiotensin II konzentrations- ($EC_{50}=100$ nmol/l) und zeitabhängig (halbmaximaler Effekt nach ca. 8 Stunden; 1 μ mol/l ANGII) die basale Renin mRNA Expression supprimiert. Diese inhibitorische Wirkung zeigte sich auch auf Ebene der Reninsynthese mit einer Reduktion der Gesamtreninaktivität auf 69% des Kontrollwertes.

Endothelin 3 führte ebenfalls zu einer konzentrations- ($EC_{50}=10$ nmol/l) und zeitabhängigen (halbmaximaler Effekt nach ca. 8 Stunden; 100 nmol/l Endothelin 3) Hemmung der basalen Reningenexpression und Reninsynthese.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen weiterhin auf eine gemeinsame Signaltransduktion der beiden Vasokonstriktoren über den Proteinkinase C Signaltransduktionsweg hin.

Beide Hormone führten zu einer signifikanten Aktivierung der Proteinkinase C. Die inhibitorische Wirkung der beiden Vasokonstriktoren auf die Reningenexpression konnte durch den PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimide I (BIM) signifikant abgeschwächt werden. Zusätzlich zeigte die direkte Aktivierung der Proteinkinase C durch den PKC-Aktivator Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) eine zur Angiotensin II bzw. Endothelin 3 Wirkung vergleichbare Reduktion der Reningenexpression und Reninsynthese, die ebenfalls durch eine Blockade der PKC signifikant abgeschwächt wurde.

ANGII bzw. Endothelin 3 hatten keinen Einfluss auf die Kinetik der Renin mRNA Abundanz nach Blockade der Transkription, so dass die Abnahme der Renin mRNA Abundanz nicht durch eine verminderte Renin mRNA Stabilität vermittelt wird.

Die beiden Hormone bewirkten aber ebenso wie eine direkte Aktivierung der PKC durch PMA eine signifikante Hemmung der Ren-1^C Promotoraktivität, so dass die Suppression der Renin mRNA Abundanz über eine durch die PKC induzierte Hemmung der

Transkriptionsaktivität und der damit einhergehenden verringerten Renin mRNA Expression erklärt werden kann. Die für die Suppression der Ren-1^C Promotoraktivität verantwortlichen regulatorischen Sequenzen dürften im Bereich der ersten 2.9 kb des 5'-flankierenden Bereichs des Ren-1^C Gens lokalisiert sein, wobei eine Beteiligung von zwei im proximalen Promotorbereich an Position -16/-22 und Position -141/-147 lokalisierter AP1-Bindungsstellen nach den Ergebnissen einer Deletionsstudie unwahrscheinlich erscheint.

VI. Literatur

- Aldred G.P., Fu P., Crawford R.J., Fernley R.T. (1993):** The sequence and tissue distribution of ovine renin. *J Mol Endocrinol* 8: 3-11
- Antonipillai I., Horton R. (1985):** Role of extra- and intracellular calcium and calmodulin in renin release from rat kidney. *Endocrinology* 117: 601-606
- Antonipillai I., Nadler J.L., Robin E., Horton R. (1987):** The inhibitory role of 12- and 15-lipoxygenase products of renin release. *Hypertension* 10: 61-66
- Ayers C.R., Vaughan E.D., Yancy M.R., Bing K.T., Johnson C.C., Morton C. (1974):** Effects of 1-sarcosine-8-alanine angiotensin II and converting enzyme inhibitor on release in dog acute reno-vascular hypertension. *Circ Res* 34/35: 127-133
- Bachmann S., Bosse H.M. (1993):** Nitric oxide synthase expression in macula densa reflects changes in tubuloglomerular balance. (Abstract) *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 10: 462
- Bachmann S., Bosse H.M., Mundel P. (1995):** Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* 268: F885-F898
- Barajas L. (1979):** Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am J Physiol* 236: F333-F343
- Barrett G.L., Horiuchi M., Paul M., Nakamura N., Pratt R.E., Dzau V.J. (1992):** Identification of a negative element involved in tissue specific expression of mouse renin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:885-889
- Beavo J.A. (1995):** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75: 725-748
- Beierwaltes W.H. (1990):** Possible endothelial modulation of prostaglandin-stimulated renin release. *Am J Physiol* 258: F1363-F1371
- Berk B.C., Aronow M.S., Brock T.A., Cragoe E., Gimbrone M.A., Alexander R.W. (1987):** Angiotensin II-stimulated Na^+/H^+ exchange in cultured vascular smooth muscle cells. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 262: 5057-5064
- Borensztein P., Germain S., Fuchs S., Philippe J., Corvol P., Pinet F. (1994):** cis-regulatory elements and trans-acting factors directing basal and cAMP-stimulated human renin gene expression in chorionic cells. *Circ Res. May*;74(5):764-73
- Brown K.D., Littlewood C.J., (1989):** Endothelin stimulates DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. Synergy with polypeptide growth factors. *Biochem J* 263: 977-980
- Burnham C.E., Hawelu-Johnson C.L., Frank B.M., Lynch K.R. (1987):** Molecular cloning of rat renin cDNA and its gene. *Proc Natl Acad Sci U S A. Aug*;84(16):5605-9.
- Burson J.M., Aguilera G., Gross K.W., Sigmund C.D. (1994):** Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol Aug*;267(2 Pt 1): E260-267
- Butt E., Nolte C., Schulz S., Beltman J., Beavo J.A., Jastorff B., Walter U. (1992):** Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol* 12: 2591-2600

- Campbell D.J. (1987):** Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 79: 1-6
- Campbell D.J. (1996):** Endogenous angiotensin II levels and the mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor type 1 antagonists. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 3(suppl): S125-S131
- Campbell W.B., Henrich W.L. (1990):** Endothelial factors in the regulation of renin release. *Kidney Int* 38: 612-617
- Carey R.M., McGrath H.E., Pentz E.S., Gomez R.A., Barrett P.Q. (1997):** Biomechanical coupling in renin releasing cells. *J Clin Invest* 100: 1566-1574
- Caroff N., DellaBruna R., Philippe J., Corvol P., Pinet F. (1993):** Regulation of human renin secretion and renin transcription by quantitative PCR in cultured chorionic cells: synergistic effect of cyclic AMP and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Jun* 30;193(3):1332-8.
- Catanzaro D.F., Mullins J.J., Morris B.J. (1983):** The biosynthetic pathway of renin in mouse submaxillary gland. *J Biol Chem* 258: 7364-7368
- Chansel D., Dussaule J., Ardaillou N., Ardaillou R. (1987):** Identification and regulation of renin in human cultured mesangial cells. *Am J Physiol* 252: F32-F38
- Chao H.S., Poisner A., Poisner R., Handwerger S. (1993):** Endothelins stimulate the synthesis and release of prorenin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab Mar*;76(3):615-9.
- Chen L.-S., Cuddy M. P., LaVallette L., (1998):** Regulation of human renin gene promoter activity: A new negative regulatory region determines the responsiveness to TNF α . *Kidney Int. Vol.* 54:2045-2055
- Chen M., Schnermann J., Smart A.M., Brosius F.C., Killen P.D., Briggs J.P. (1993):** Cyclic AMP selectively increases renin mRNA stability in cultured juxtaglomerular granular cells. *J Biol Chem* 268: 24138-24144
- Cheng H.F., Wang J.L., Zhang M.Z., Miyazaki Y., Ichikawa I., McKanna J.A., Harris R.C. (1999):** Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 103: 953-961
- Chiu T., Reid I.A. (1996):** Role of cyclic GMP inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoreceptor control of renin secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 793-799
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Churchill P.C. (1985):** Second messengers in renin secretion. *Am J Physiol* 249: F175-F184
- Churchill P.C., Churchill M.C. (1984):** 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) inhibits renin secretion of rat renal cortical slices. *J Hypertens* 2: S25-S28
- Clark A.F., Sharp M.G.F., Morley S.D., Fleming S., Peters J., Mullins J.J. (1997):** Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol Chem* 272:18185-18190
- Daniel T.O., Ives H.E. (1989):** Endothelial control of vascular function. *News Physiol Sci* 4: 139-142
- Davis J.O., Freeman R.H. (1976):** Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev* 56: 1-56

- Davis J.O., Freeman R.H. (1976):** Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev. Jan*;56(1): 1-56
- DellaBruna R., Kurtz A., Corvol P., Pinet F. (1993):** Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells: Short term effects of cAMP on renin mRNA and secretion. *Circ Res* 73: 639-648
- DellaBruna R., Kurtz A., Schricker K. (1996):** Regulation of renin synthesis in the juxtaglomerular cells. *Curr Opinion Nephrol Hypertens* 5: 16-17
- DellaBruna R., Pinet F., Corvol P., Kurtz A. (1991):** Regulation of renin secretion and renin synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cell Physiol Biochem* 1: 98-110
- DellaBruna R., Pinet F., Corvol P., Kurtz A. (1992):** Calmodulin antagonists stimulate renin secretion and inhibit renin synthesis in vitro. *Am J Physiol* 262: F397-F402
- DellaBruna R., Pinet F., Corvol P., Kurtz A. (1995):** Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 47: 1266-1273
- DellaBruna R., Schricker K., Holmer S., Kurtz A. (1995):** Rat renin gene transcription is initiated at a single start site. *FEBS Lett* 372: 157-160
- Dzau V.J. (1993):** Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. In: *Angiotensin and the Heart: Hersg: Grobecker H., Heusch G., Strauer B.E., Darmstadt, Steinkopff; New York, Springer*
- Dzau V.J., Burt D.W., Pratt R.E. (1988):** Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 255: F563-F573
- Dzau V.J., Gibbons G.H. (1987):** Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in hypertension. *Am J. Cardiol* 60: 991-1031
- Ehrlich H.A., Gelfand D., Sninsky J. (1991):** Recent advances in the Polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651
- Firth J.D., Ratcliffe P.J. (1992):** Organ distribution of the three endothelin rat messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* 90: 1023-1031
- Fray J.C.S., Lush D.J. (1984):** Stretch receptor hypothesis for renin secretion: the role of calcium. *J Hypertens* 2 (suppl 1): 19-23
- Fray J.C.S. (1980):** Stimulus secretion coupling of renin: role of hemodynamics and other factors. *Circ Res* 47: 485-492
- Fray J.C.S., Lush D.J. (1976):** Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney. *Am J Physiol* 231: 936-944
- Fukamizu A., Nishi K., Cho T., Saitoh M., Nakayama K., Ohkubo H., Nakanishi S., Murakami K. (1988):** Structure of the rat renin gene. *J Mol Biol. May* 20;201(2):443-50.
- Gasc J.M., Monnot C., Clauser E., Corvol P. (1993):** Co-expression of type 1 angiotensin II receptor (AT1R) and renin mRNAs in juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Endocrinology Jun*;132(6):2723-5
- Gerber J.G., Nies A.S., Olsen R.D. (1981):** Control of canine renin release: Macula densa requires prostaglandin synthesis. *J Physiol* 319: 419-429

- Germain S., Bonnet F., Fuchs S., Philippe J., Corvol P., Pinet F. (1999):** Dissection of silencer elements in first intron controlling the human renin gene. *J Hypertension* 17: 817-832
- Germain S., Bonnet F., Philippe J., Fuchs S., Corvol P., Pinet F. (1998):** A novel distal enhancer confers chorionic expression on the human renin gene. *J Biol Chem* 273: 25292-25300
- Germain S., Konoshita T., Fuchs S., Philippe J., Corvol P., Pinet F. (1997):** Regulation of human renin gene transcription by cAMP. *Clin Exp Hypertension* 19: 543-550
- Germain S., Konoshita T., Philippe J., Corvol P., Pinet F. (1996):** Transcriptional induction of the human renin gene by cyclic AMP requires cyclic AMP response element-binding protein (CREB) and a factor binding a pituitary-specific trans-acting factor (Pit-1) motif. *Biochem J* 316: 107-113
- Germain S., Philippe J., Fuchs S., Lengronne A., Corvol P., Pinet F. (1997):** Regulation of human renin secretion and gene transcription in Calu-6 cells. *FEBS Lett* 407:177-183
- Gilbert M.T., Sun J., Yan Y., Oddoux C., Lazarus A., Tansey W.P., Lavin T.N. Catanzaro D.F. (1994):** Renin gene promoter activity in GC cells is regulated by cAMP and thyroid hormone through Pit-1-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 269: 28049-28054
- Greenberg S.G., He X.R., Schnermann J.B., Briggs J.P. (1995):** Effect of nitric oxide on renin secretion. I. studies in isolated juxtaglomerular granular cells. *Am J Physiol* 268: F948-F952
- Greenberg S.G., Lorenz J.N., He X.R., Schnermann J.B., Briggs J.P. (1993):** Effect of prostaglandin synthesis inhibition on macula densa-stimulated renin secretion. *Am J Physiol* 265: F578-F583
- Hackenthal E., Paul M., Ganten D., Taugner R. (1990):** Morphology, Physiology and Molecular Biology of Renin Secretion. *Physiol Reviews* 70: 1067-1116
- Hahn A.W., Resink T.J., Scott-Burden T., Powell J., Dohi Y., Buhler F.R. (1990):** Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* 1: 649-659
- Harding P., Sigmon D.H., Alfie M.E., Huang P.L., Fishman M.C., Beierwaltes W.H., Carretero O.A. (1997):** Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low sodium diet. *Hypertension* 29: 297-302
- Hardman J.A., Hort Y.J., Catanzaro D.F. et al (1984):** Primary structure of the human renin gene. *DNA* 3: 457-468
- Harris R.C., McKanna J.A., Akai Y., Jacobson H.R., Dubois R.N., Breyer M.D. (1994):** Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 94(6): 2504-2510
- Henrich W.L. (1981):** Role of prostaglandins in renin secretion. *Kidney Int* 19: 822-830
- Henrich W.L., McAllister E.A., Smith P.B., Campbell W.B. (1988):** Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate as a mediator of inhibition of renin release. *Am J Physiol* 255: F474-F478
- Hirose S., Kim S., Miyazaki H., Park Y.S., Murakami K. (1985):** In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. *J Biol Chem.* Dec 25;260(30):16400-5.

- Holmer S., Eckardt K.U., Aedtner O., LeHir M., Schricker K., Hamann M., Götz K.H., Riegger G., Moll W., Kurtz A. (1993):** Which factor mediates reno-renal control of renin gene expression? *J Hypertens* 11: 1011-1019
- Holmer S., Eckardt K.U., LeHir M., Schricker K., Riegger G., Kurtz A. (1993):** Influence of dietary NaCl intake on renin gene expression in the kidneys and adrenal glands of rats. *Pflügers Arch* 425: 62-67
- Holmer S., Rinne B., Eckardt K.U., LeHir M., Schricker K., Kaissling B., Riegger G.A.J., Kurtz A. (1993):** Role of renal nerves for expression of renin in adult rat kidney. *Am J Physiol*, 266:F738-F745.
- Holmer S.R., Kaissling B., Putnik K., Pfeifer M., Krämer B.K., Riegger A.J., Kurtz A. (1997):** Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J Hypertens* 15: 1471-1479
- Horbat P.M., Fogliano M.I., O'Connor B.A., Schaefer I.M., Chirgwin J.M. (1984):** Human renin gene: structure and sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 5026-5030
- Horiuchi M., Nakamura N., Tang S., Barrett G., Dzau V.J. (1991):** Molecular mechanism of tissue-specific regulation of mouse renin gene expression by cAMP. Identification of an inhibitory protein that binds nuclear transcriptional factor. *J Biol Chem* 266:16247-16254
- Horiuchi M., Pratt R.E., Nakamura N., Dzau V.J. (1993):** Distinct nuclear proteins competing for an overlapping sequence of cAMP and negative-regulatory elements regulate tissue-specific mouse renin gene expression. *J Clin Invest* 92: 1805-1811
- Ichihara A., Suzuki H., Murakami M., Naitoh M., Matsumoto A., Saruta T. (1995):** Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *Eur J Endocrinol* Nov;133(5):569-77
- Imai T., Miyazaki H., Hirose S. et al. (1983):** Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7405-7409
- Jensen B.L., Krämer B.K., Kurtz A. (1997):** Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29: 1148-1155
- Jensen B.L., Schmid C., Kurtz A. (1996):** Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 271: F659-F669
- Jensen B.L., Skott O. (1993):** Osmotically sensitive renin release from permeabilized juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 265: F87-F95
- Johns D.W., Peach M.J., Gomez R.A., Inagami T., Carey R.M. (1990):** Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am J Physiol* Dec;259(6 Pt 2):F882-887
- Johnson J.A., Davis J.O. (1973):** Angiotensin II: Important role in the maintenance of arterial pressure. *Science* 179: 906-907
- Jutras I., Reudelhuber T.L. (1999):** Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett* 443: 48-52
- Keeton K., Campbell W.B. (1981):** The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 31: 81-227
- Keeton T.K., Pettinger W.A., Campbell W.B. (1976):** The effects of altered sodium balance and adrenergic blockade on renin release induced in rats by angiotensin antagonism. *Circ Res* 38: 531-539

- Khayat A., Gonda S., Sen S., Smeby R.R. (1981):** Responses of juxtaglomerular cell suspensions to various stimuli. *Hypertension Mar-Apr;3(2): 157-167*
- Kikkawa Y., Yamanaka N., Tada J., Kanamori N., Tsumura K., (1998):** Prorenin processing and restricted endoproteolysis by mouse tissue kallikrein family enzymes (mK1, mK9, mK13, and mK22). *Biochem Biophys Acta 1382: 55-64*
- Kohan D.E. (1993):** Endothelins in the Kidney: Physiology and Pathophysiology. *Am J Kidney Diseases 22: 493-510*
- Kohara K., Brosnihan K.B., Ferrario C.M., Milsted A. (1992):** Peripheral and central angiotensin II regulates expression of genes of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol 262: E651-E657*
- Kon Y., Endoh D. (1999):** Renin in exocrine glands of different mouse strains. *Anat Histol Embryol. Aug;28(4):239-42.*
- Krämer B.K., Nishida M., Kelly R.A. Smith T.W. (1992):** Endothelins - myocardial actions of a new class of cytokines. *Circulation 85: 350-356*
- Kurtz A. (1989):** Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmacol 113: 1-40*
- Kurtz A., DellaBruna R., Pfeilschifter J., Bauer C. (1988):** Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int 33: 798-803*
- Kurtz A., DellaBruna R., Scholz H., Baier W. (1991):** Amiloride enhances the secretion but not the synthesis of renin in renal juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch Aug;419(1):32-37*
- Kurtz A., DellaBruna R., Taugner R., Bauer C. (1986):** Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from isolated renal juxtaglomerular cells by cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA, 83: 4769-4773*
- Kurtz A., Götz K.H., Hamann M., Kieninger M., Wagner C. (1998):** Stimulation of renin secretion by NO-donors is related to the cyclic-AMP pathway. *Am J Physiol 274: F709-F712*
- Kurtz A., Götz K.H., Hamann M., Wagner C. (1998):** Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc Natl Acad Sci USA 95: 4743-4747*
- Kurtz A., Muff R., Born W., Lundberg J.M., Milberg B.J., Gnädinger M.P. (1988)** Calcitonin gene related peptide is stimulator of renin secretion. *J Clin Invest 82: 538-543*
- Kurtz A., Penner R. (1989):** Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci USA 86: 3423-3427*
- Kurtz A., Pfeilschifter J., Hutter A., Bührle C., Nobiling R., Taugner R., Hackenthal E., Bauer C. (1986):** Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol 250: C563-C571*
- Kurtz A., Scholz H., Della Bruna R. (1990):** Molecular mechanisms of renin release. *J Cardiovasc Pharmacol 16 (Suppl.4): S1-S7*
- Kurtz A., Wagner C. (1998):** Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol 275: F849-F862*
- Kurtz A., Wagner C. (1999):** Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol 202: 219-225*

- Kurtz A., Wagner C. (1999):** Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10: S162-S168
- Laframboise M., Reudelhuber T.L., Jutras I., Brechler V., Seidah N.G., Day R., Gross K.W., Deschepper C.F. (1997):** Prorenin activation and prohormone convertases in the As4.1 cell line. *Kidney Int* 51: 104-109
- Lang J.A., Ying L-H., Morris B.J., Sigmund C.D. (1996):** Transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human renin gene expression in Calu-6 cells. *Am J Physiol* 271: F94-F100
- Ludwig G., Ganten D., Murakami K., Fasching U., Hackenthal E. (1987):** Relationship between renin mRNA and renin secretion in adrenalectomized, salt-depleted, or converting enzyme inhibitor-treated rats. *Mol Cell Endocrinol* 50: 223-229
- Makrides S.C., Mulinari R., Zannis V.I., Gavras H. (1988):** Regulation of renin gene expression in hypertensive rats. *Hypertension* 12: 405-410
- Matsusaka T., Nishimura H., Utsunomiya H., Kakuchi J., Niimura F., Inagami T. (1996):** Chimeric mice carrying regional targeted deletion of the angiotensin type 1A receptor gene. Evidence against the role of local angiotensin in the *in vivo* feedback regulation of renin synthesis in juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* 15: 1867-1877
- McDonald K.M., Taher S., Aisenbrey G., De Torrente A., Schrier RW. (1975):** Effect of angiotensin II and an angiotensin II inhibitor on renin secretion in the dog. *Am J Physiol* May;228(5): 1562-1567.
- Modena B., Holmer S., Eckardt K.U., Schricker K., Riegger G., Kaissling B., Kurtz A. (1993):** Furosemide stimulates renin expression in the kidney of salt-supplemented rats. *Pflügers Arch* 424: 403-409
- Moe O., Tejedor A., Campbell W.B., Alpern R.J., Henrich W.L. (1991):** Effects of endothelin on in vitro renin secretion. *Am J Physiol* 260: E521-E525
- Moffet R.B., McGowan R.A., Gross K.W. (1986):** Modulation of kidney renin messenger RNA levels during experimentally induced hypertension. *Hypertension* 8: 874-882
- Morris B.J. (1992):** Molecular biology of renin II: gene control by messenger RNA, transfection and transgenic studies. *J Hypertension* 10: 337-342
- Morris B.J. (1996):** Molecular biology of renin. In: Lindpaintner K., Ganten D.: Molecular reviews in cardiovascular medicine. *Chapman & Hall, London*, 12-32
- Morris B.J. , (1992):** Molecular biology of renin I: gene and protein structure, synthesis and processing. *Physiol Rev* 70: 1067-1116
- Mullins J.J., Sigmund C.D., Kane-Haas C., McGowan R.A., Gross K.W. (1989):** Expression of the DBA/2J Ren-2 gene in the adrenal gland of transgenic mice: *EMBO J* 8: 4065-4072
- Mundel P., Bachmann S., Bader M., Fischer A., Kummer W., Mayer B., Kriz W. (1992):** Expression of nitric oxide synthase in macula densa cells. *Kidney Int* 42: 1017-1019
- Nakamura A., Iwao H., Fukui K., Kimura S., Tamaki T., Nakanishi S., Abe Y. (1990):** Regulation of liver angiotensinogen and kidney renin mRNA levels by angiotensin II. *Am J Physiol* 258: E1-E6

- Nakamura N., Burt D.W., Paul M., Dzau V.J. (1989):** Negative control elements and cAMP responsive sequences in the tissue-specific expression of mouse renin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A. Jan*;86(1):56-9.
- Nakamura N., Soubrier F., Menard J., Panthier J.J., Rougeon F., Corvol P. (1985):** Nonproportional changes in plasma renin concentration, renal renin content, and rat renin messenger RNA. *Hypertension Nov-Dec*;7(6 Pt 1):855-859
- Neves F.A., Duncan K.G., Baxter J.D. (1996):** Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* 27: 514-517
- Noble A.R., Abu-Kishk, Dalioa M.A., Williams B.C., Lush D.J. (1994):** Cyclic GMP-linked pathway for renin secretion. *Kidney Int* 64: 1588-1590
- Ogawa K., Yamasato M., Taniguchi K. (1995):** Exocytosis of secretory granules in the juxtaglomerular granular cells of kidneys. *Anat Rec* 243: 336-346
- Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. (1987):** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
- Panthier J.J., Foote S., Chambroud B., Strosber A.D., Corvol P., Rougen F. (1982):** Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298: 90-92
- Park C.S., Chang S.H., Lee H.S., Kim S.H., Chang J.W., Hong C.D. (1996):** Inhibition of renin secretion by Ca^{2+} through activation of myosin light chain kinase. *Am J Physiol* 271: C242-C247
- Park C.S., Chang S.H., Lee H.S., Kim S.H., Chang J.W., Hong C.D. (1996):** Inhibitory effect of Ca^{2+} on renin secretion elicited by chemiosmotic stimuli through actomyosin mediation. *Am J Physiol* 271: C248-C254
- Park C.S., Honeyman T.W., Chung E.S, Lee J.S., Sigmon D.H., Fray J.C. (1986):** Involvement of calmodulin in mediating inhibitory action of intracellular Ca^{2+} on renin secretion. *Am J Physiol* 251, F1055-F1062
- Park C.S., Hong C.D., Honeyman T.W. (1992):** Calcium-dependent inhibitory step in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 262: F793-F798
- Petrovic N., Black T.A., Fabian J.R., Kane C., Jones C.A., Loudon J.A., Abonia J.P., Sigmund C.D., Gross K.W. (1996):** Role of proximal promoter elements in regulation of renin gene transkription. *J Biol Chem* 271: 22499-22505
- Pfeilschifter J., Kurtz A., Bauer C. (1985):** Inhibition of renin release by platelet activating factor in cultured rat juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 127: 903-910
- Pinet F., Mizrahi J., Laboulandine I., Menard J., Corvol P. (1987):** Regulation of prorenin secretion in cultured human transfected juxtaglomerular cells. *J Clin Invest Sep*;80(3):724-731
- Pratt R.E., Quellette A.J., Dzau V.J. (1983):** Biosynthesis of renin: multiplicity of active and intermediate forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6809-6813
- Rakugi H., Nakamura M., Saito H., Higaki J., Ohihara T. (1988):** Endothelin inhibits renin release from isolated rat glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 1244-1247
- Reid I.A., Chiu Y.J. (1995):** Nitric oxide and the control of renin secretion. *Fund Clin Pharmac* 9: 309-323

- Ritthaler T., DellaBruna R., Krämer B.K., Kurtz A. (1996):** Endothelins inhibit cyclic-AMP induced renin gene expression in cultured mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 50: 108-115
- Ritthaler T., Scholz H., Ackermann M., Riegger G.A.J., Kurtz A., Krämer B.K. (1995):** Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 268: F39-F45
- Robertson J.I.S., Nichols G. (1993):** The renin-angiotensin system Vol I. *Gower Medical Publishing*
- Schmidt H.W., Lohmann S.M., Walter U. (1993):** The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanisms of action. *Biochem Biophys Acta* 1178: 153-175
- Scholz H., Hamann M., Götz K.H., Kurtz A. (1994):** Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflügers Arch* 428: 173-178
- Scholz H., Krämer B.K., Hamann M., Kurtz A. (1995):** Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand* 155: 173-182
- Scholz H., Kurtz A. (1993):** Endothelium derived relaxing factor is involved in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *J Clin Invest* 91: 1088-1091
- Scholz H., Vogel U., Kurtz A. (1993):** Interrelation between baroreceptor and macula densa mechanisms in the control of renin secretion. *J Physiol* 469: 511-524
- Schricker K., DellaBruna R., Hamann M., Kurtz A. (1994):** Endothelium derived relaxing factor is involved in the pressure control of renin gene expression in the kidney. *Pflügers Arch*
- Schricker K., DellaBruna R., Kurtz A. (1993):** Extracellular calcium exerts a dual effect on renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *Pflügers Arch* 423: 14-20
- Schricker K., Hamann M., Kaissling B., Kurtz A. (1993):** Role of the macula densa in the control of renal renin gene expression in two kidney/one clip rats. *Pflügers Arch* 469: 511-524
- Schricker K., Hamann M., Kaissling B., Kurtz A. (1994):** Renal autacoids are involved in the stimulation of renin gene expression by low perfusion pressure. *Kidney Int* 46: 1330-1336
- Schricker K., Hamann M., Kurtz A. (1995):** Nitric oxide and prostaglandins are involved in the macula densa control of the renin system. *Am J Physiol* 269: F825-F830
- Schricker K., Hamann M., Kurtz A. (1995):** Prostaglandins are involved in the stimulation of renin gene expression in 2 kidney-1 clip rats. *Pflügers Arch* 430: 188-194
- Schricker K., Hegyi I., Hamann M., Kaissling B., Kurtz A. (1995):** Tonic stimulation of renin gene expression by nitric oxide is counteracted by tonic inhibition through angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8006-8010
- Schricker K., Holmer S., Krämer B.K., Riegger G.A.J., Kurtz A. (1997):** The role of angiotensin II in the feedback control of renin gene expression. *Pflügers Arch.* 434:166-172.
- Schricker K., Holmer S.R., Krämer B.K., Riegger G.A.J., Kurtz A. (1994):** Control of renin gene expression in two-kidney one-clip rats. *Kidney International* 46: 1539-1541
- Schricker K., Kurtz A. (1993):** Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol* 265: F180-F185

- Schricker K., Kurtz A. (1996):** Blockade of nitric oxide formation inhibits the stimulation of the renin system by a low salt intake. *Pflügers Arch* 432: 187-191
- Schunkert H., Ingelfinger J.R., Jacob H., Jackson B., Bouyounes H., Dzau V.J. (1992):** Reciprocal feed back regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expression by angiotensin II. *Am J Physiol* 263: E863-E869
- Shi Q., Black T.A., Gross K.W., Sigmund C.D. (1999):** Species-specific differences in positive and negative regulatory elements in the renin gene enhancer: *Cir Res* 85: 479-488
- Sigmund C.D., Jones C.A., Mullins J.J., Kim U., Gross K.W. (1990):** Tissue and cell specific expression of a renin promoter-reporter gene construct in transgenic mice: *Biochem Biophys Res Commun* 170:344-350
- Sigmund C.D., Okuyama K., Ingelfinger J., Jones C.A., Mullins J.J., Kane C., Kim U., Wu C., Kenny L., Rustum Y., Dzau V.J., Gross K.W. (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
- Simonson M.S. (1993):** Endothelins: Multifunctional renal peptides. *Physiol Rev* 73: 375-411
- Singh I.J., Graham M., Schnermann J., Briggs J.P. (1995):** Effect of dietary salt on type 1 NOS gene expression in the rat kidney (abstract). *FASEB J* 9: 4888
- Sinn P.L., Sigmund C.D. (1999):** Human renin mRNA stability is increased in response to cAMP in Calu-6 cells. *Hypertension* 33: 900-905
- Skinner S., McCubbin J.W., Page I.H. (1964):** Control of renin secretion. *Circ Res* 15: 64-76
- Skott O. (1986):** Episodic release of renin from single isolated superperfused rat afferent arterioles. *Pflügers Arch* 407: 41-45
- Skott O. (1988):** Do osmotic forces play a role in renin secretion? *Am J Physiol* 255: F1-F10
- Skott O., Taugner R. (1987):** Effects of extracellular osmolality on renin release and on the ultrastructure of the juxtaglomerular epithelioid cell granules. *Cell Tissue Res* 249: 325-329
- Sola C., Tronik D., Dreyfus M., Babinet C., Rougeon F. (1989):** Renin-promoter SV40 T-antigen transgenes induce tumors irrespective of normal cellular expression of renin genes. *Oncogene Res* 5: 149-153
- Stella A., Macchi A., Genovesi S., Centonza L., Zanchetti A. (1989):** Angiotensin converting enzyme inhibition and renin release from the kidney. *J Hypertens* 7: S21-S25
- Sun J., Oddoux C., Gilbert M.T., Yan Y., Lazarus A., Campbell W.G., Catanzaro D.F. (1994):** Pituitary specific transcription factor (Pit-1) binding site in the human renin gene 5'-flanking DNA stimulates promoter activity in placental cell primary cultures and pituitary lactosomatotropic cell lines. *Cir Res* 75: 624-629
- Sun J., Oddoux C., Lazarus A., Gilbert M.T., Catanzaro D.F. (1993):** Promoter activity of human renin 5'-flanking DNA sequences is activated by the pituitary-specific transcription factor Pit-1. *J Biol Chem* 268: 1505-1508
- Takagi M., Matsuoka H., Atarashi K., Yagi S. (1988):** Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1164-1168

- Tamura K., Tanimoto K., Murakami K., Fukamizu A. (1993):** A combination of upstream and proximal elements is required for efficient expression of the mouse renin promoter in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 20: 3617-3623
- Tamura K., Tanimoto K., Murakami K., Fukamizu A. (1993):** Activation of mouse renin promoter by cAMP and c-Jun in a kidney-derived cell line. *Biochem Biophys Acta* 1172: 306-310
- Tamura K., Umemura S., Nyui N., Yabana M., Toya Y., Fukamizu A., Murakami K., Ishii M. (1998):** Possible role of c-Jun in transcription of the mouse renin gene. *Kidney Int. Aug; 54(2):*382-93.
- Tamura K., Umemura S., Nyui N., Yamaguchi S., Ishigami T., Hibi K., Yabana M., Kihara M., Fukamizu A., Murakami K., Ishii M. (1997):** A novel proximal element mediates the regulation of mouse Ren-1C promoter by retinoblastoma protein in cultured cells. *J Biol Chem* 272: 16845-16851
- Tamura K., Umemura S., Yamaguchi S., Iwamoto T., Kobayashi S., Fukamizu A., Murakami K., Ishii M. (1994):** Mechanism of cAMP regulation of renin gene transcription by proximal promoter. *J Clin Invest* 94: 1959-1967
- Taugner R., Bührle C.P., Hackenthal E., Mannek E., Nobiling R. (1984):** Morphology of the juxtaglomerular apparatus. *Contr Nephrol* 43: 76-101
- Taugner R., Bührle C.P., Nobiling R. (1984):** Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res* 237: 459-472
- Taugner R., Nobiling R., Metz R., Taugner F., Buhrle C., Hackenthal E. (1988):** Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell Tissue Res* 252: 687-690
- Tomita S., Tomita N., Yamada T., Zhang L., Kaneda Y., Morishita R., Ogihara T., Dzau V.J., Horiuchi J. (2000):** Transcription factor decoy to study the molecular mechanism of negative regulation of renin gene expression in the liver in vivo. *Cir Res* 84: 1059-1066
- Toullec D., Pianetti P., Coste H., Bellevergue P., Grand-Perret T., Ajakane M., Baudet V., Boissin P., Boursier E., Loriolle F. et al. (1991):** The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem Aug 25; 266(24):* 15771-81
- Tronik D., Dreyfus M., Babinet C., Rougeon F. (1987):** Regulated expression of the Ren-2 gene in transgenic mice derived from parental strains carrying only the Ren-1 gene. *EMBO J* 6: 983-987
- Tronik D., Rougeon F.(1988):** Thyroxine and testosterone transcriptionally regulate renin gene expression in the submaxillary gland of normal and transgenic mice carrying extra copies of the Ren2 gene. *FEBS Lett* 234: 336-340
- Tufro-McReddie A., Johns D.W., Geary K.M., Dagli H., Everett A.D., Chevalier R.L., Carey R.M., Gomez R.A. (1994):** Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. *Am J Physiol* 266: F911-F918
- Uchida Y., Ninomiya H., Saotome M., Nomura A., Ohtsuka M., Yanagisawa M., Goto K., Masaki T., Hasegawa S. (1988):** Endothelin a novel vasokonstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol* 154: 227-238
- Vander A.J., Geelhoed G.W. (1965):** Inhibition of renin secretion by angiotensin. II. *Proc Soc Exp Biol Med Nov;120(2):*399-403

- Vander A.J., Miller R. (1968):** Control of renin secretion in the anesthetized dog. *Am J Physiol* 207: 537-546
- Vandogen R., Peart W.S. (1974):** Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br J Pharmac* 50 : 125-129
- Vandongen R., Peart W.S., Boyd G.W. (1974):** Effect of angiotensin II and its nonpressor derivatives on renin secretion. *Am J Physiol Feb*;226(2):277-82
- Voightländer T., Ganten D., Bader M. (1999):** Transcriptional regulation of the rat renin gene by regulatory elements in intron I. *Hypertension* 333: 303-311
- Voightländer T., Ripperberger A., Ganten D., Bader M. (1995):** Transcriptional silencer in intron I of the rat renin gene. *Adv Exp Med Biol* 377:285-292
- Wagner C., Jensen B.L., Krämer B.K., Kurtz A. (1998):** Control of the renin system by local factors. *Kidney Int*
- Wagner C., Kees F., Krämer B.K., Kurtz A. (1997):** Role of sympathetic nerves for the stimulation of the renin system by angiotensin II receptor blockade. *J Hypertens* 15: 1463-1469,
- Wagner C., Pfeiffer A., Ruth P., Hofmann F., Kurtz A. (1998):** Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102: 1576-1582
- Wilcox C.S., Welch W.J., Murad F., Gross S.S., Taylor G., Levi R., Schmidt H.W. (1992):** Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11993-11997
- Yamada T., Horiuchi M., Morishita R., Zhang L., Pratt R.E., Dzau V.J. (1995):** In vivo identification of a negative regulatory element in the mouse renin gene using a direct gene transfer. *J Clin Invest* 96: 12030-1237
- Yan Y., Jones C.A., Sigmund C.D. Gross K.W., Catanzaro D.F. (1997):** Conserved enhancer elements in human and mouse renin genes have different transcriptional effects in As4.1 cells. *Cir Res* 81: 558-566
- Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. (1988):** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415
- Ying L., Morris B.J., Sigmund C.D. (1997):** Transactivation of the human renin promoter by the cyclic AMP/protein kinase A pathway is mediated by both cAMP-responsive element binding protein-1 (CREB)-dependent and CREB-independent mechanisms in Calu-6 cells. *J Biol Chem* 272: 2412-2420
- Yoshizawa M., Kurihara H., Sugiyama T., Takamu F. Yanagisawa M., Masaki T., Yazaki Y. (1989):** Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 859-864
- Zhang J.X., Bauer M., Clemens M. (1995):** Vessel- and target cell-specific action of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver. *Am J Physiol* 269: G269-27

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung der exzellenten Forschungsbedingungen. Seine engagierte Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine freundschaftliche Art trugen wesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit bei.

Bei Frau Dr. Bianca Mann möchte ich mich für ihre Freundschaft und ihre kompetente Beratung und Hilfestellung in allen Lebenslagen bedanken.

Meiner Schwester Kerstin und meinem Schwager Stefan danke ich für das gewissenhafte Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

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

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

Regensburg, den 02.02.2001

Markus W.H. Müller