

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie, CCM
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Molekulare Mechanismen der transkriptionellen Regulation des
Renin-Gens*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thomas Brinkmeier
aus Hagen

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. R. Mrowka
 2. Prof. Dr. H. Scholz
 3. Prof. Dr. T. Zimmer

Datum der Promotion: 22.3.2013

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	6
1.1	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	6
1.2	Renin	8
1.2.1	Struktur und Funktion.....	8
1.2.2	Regulation der Freisetzung von Renin	8
	Blutdruck und Salzhaushalt.....	8
	Vegetatives Nervensystem, endokrine und parakrine Mechanismen	9
	Interzelluläre Kommunikation.....	9
1.2.3	Regulation der Renin-Synthese.....	10
	Modelle zur Erforschung der Renin-Transkription.....	10
	Cis-Elemente in der Regulation der Renin-Transkription.....	11
	Posttranskriptionelle Mechanismen	15
1.3	Der nukleäre Rezeptor HNF4α	16
1.3.1	HNF4-Zielgene und Pathophysiologie.....	16
1.3.2	DNA-Bindung und Regulation der HNF4-Aktivität	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2	<i>Materialien und Methoden</i>	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Plasmide	19
2.1.2	Oligonukleotide (Primer)	20
2.1.3	Lösungen und Puffer.....	23
2.1.4	Chemikalien, Kits, Enzyme und Verbrauchsmaterial	23
2.1.5	Geräte	25
2.1.6	Spezialsoftware und Webdienste.....	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Klonierung von Reporterplasmiden	27
	Generierung der PCT3A-D – Konstrukte	27
	Generierung der Deletionskonstrukte PCT3Ad1-d9 und PCT3Bd1	29
	Generierung der Mutationskonstrukte HNF4A-C und HRE-like.....	32
2.2.2	Luciferase – Reporterassays	32
	Kultur der HEK 293 – Zellen	32
	Transfektion und Stimulation der HEK293 – Zellen	33
	Lyse der Zellen und Messung im Luminometer	33
2.2.3	Untersuchungen zum Renin-mRNA-Gehalt in der JG-Zellkultur	33

Herstellung von Eicosapentaensäure-Albuminlösung	33
JG-Zellpräparation, Zellkultur und Stimulation der Zellen	34
Isolation der mRNA und Reverse Transkription	35
Quantifizierung der Renin-mRNA mittels Real-Time-PCR	35
2.2.4 In-silico-Analysen	36
Transkriptionsfaktorbindungsstellen	36
Evolutionäre Konserviertheit	36
2.2.5 Statistik	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Einfluss einer bei ca. -13kbp stromaufwärts des Renin-Gens gelegenen nicht-codierenden Region (PCT3) auf die Renin-Promotoraktivität	37
3.1.1 Bioinformatische Analysen zur PCT3-Region	37
Evolutionäre Konserviertheit	38
Potentiell relevante Transkriptionsfaktor – Bindungsstellen im PCT3A-Fragment	38
3.1.2 Luciferase-Reporterassays	39
Einfluss der Teilregionen PCT3A-D auf den Renin-Promotor unter Stimulation mit Mediatoren der Renin – Transkription (Forskolin, Angiotensin II, TNF α , Phorbolster)	39
Deletion von ca. 20bp umfassenden Teilfragmenten des PCT3A-Elementes	42
Stimulation der PCT3A-Deletionskonstrukte mit TNF α	44
3.2 Einfluss des nukleären Rezeptors HNF4 auf nicht-codierende DNA-Elemente stromaufwärts des Renin-Gens	45
3.2.1 Identifikation potentieller HNF4-Bindungsstellen stromaufwärts des Renin – Gens	45
3.2.2 Luciferase – Reporterassays	46
Einfluss einer HNF4-Überexpression auf nicht-codierende DNA-Elemente stromaufwärts des Renin-Gens	46
Deletion einer potentiellen HNF4 – Bindungsstelle im PCT3B - Konstrukt	48
Mutation von drei potentiellen HNF4-Bindungsstellen innerhalb -5797bp stromaufwärts des Renin-Gens	49
3.3 Einfluss von Eicosapentaensäure auf den Renin-mRNA-Gehalt in nativen kultivierten JG-Zellen	51
4 Diskussion	53
4.1 Die Bedeutung der PCT3-Region für die Regulation der Renin-Transkription ..	53
4.2 Der Einfluss des nukleären Rezeptors HNF4 auf die Expression des Renin-Gens	57
4.3 Regulation der Renin - Expression durch Eicosapentaensäure	60
5 Zusammenfassung	63

6	<i>Literaturverzeichnis</i>	65
7	<i>Anhang</i>	75

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAAS) stellt im menschlichen Körper eines der wichtigsten Langzeit-Regulationssysteme für Blutdruck, Wasser- und Elektrolythomöostase dar. In der Leber synthetisiertes Angiotensinogen wird in der Niere durch das Enzym Renin zu Angiotensin I gespalten, das durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) vornehmlich in der Lunge zu dem Oktapeptid Angiotensin II aktiviert wird ¹. Angiotensin II wiederum wirkt über Membranrezeptoren auf glatten Gefäßmuskelzellen direkt vasokonstriktorisch und regt in der Nebennierenrinde die Synthese des Mineralokortikoids Aldosteron an, das im Sammelrohr die Rückresorption von Na⁺ und Cl⁻-Ionen sowie die Sekretion von K⁺ verstärkt ¹⁻³. Über beide Mechanismen wird damit ein Anstieg des arteriellen Blutdrucks bewirkt. Zudem werden inflammatorische und fibrosierende Prozesse in Herz und Niere durch die Wirkung von Angiotensin II und Aldosteron beeinflusst ^{4,5}. Seit 2002 ist als eine weitere Komponente des Systems ein Renin-Rezeptor bekannt, der durch Bindung des Renins oder seiner Vorstufe Prorenin sowohl dessen enzymatische Aktivität beeinflussen als auch vollständig Angiotensinogen-unabhängige Renineffekte vermitteln kann ^{2,6,7}. Neben dem systemischen RAAS sind zahlreiche organspezifische, lokale Renin-Angiotensinsysteme mit Expression der beteiligten Komponenten in den jeweiligen Zellen bekannt (u.a. in verschiedenen Nephronabschnitten der Niere, im Myokard und im ZNS), die gewebespezifische Effekte vermitteln ⁸.

Da die Spaltung von Angiotensinogen durch Renin beim Menschen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Aktivierungskaskade des RAAS ist ⁹, kommt gerade der Untersuchung der Regulation von Reninfreisetzung und –synthese durch mechanische, endokrine, neuronale und metabolische Faktoren eine entscheidende Rolle zu. Ein besseres Verständnis der Regulation des RAAS hat in diesem Netzwerk mit seinen vielfältigen Verknüpfungspunkten bereits zu wichtigen Erkenntnissen zur Pathogenese so weit verbreiteter Erkrankungen wie der arteriellen Hypertonie, Atherosklerose, Herzinsuffizienz und dem metabolischen Syndrom beigetragen ¹⁰.

Während das RAAS bereits seit Entwicklung der ACE-Hemmer in den 1970er- und 1980er-Jahren sowie der AT1-Rezeptor-Antagonisten in den 1990er-Jahren Ziel phar-

makologischer Interventionen ist und auf diesem Wege bereits große Fortschritte in der Therapie der arteriellen Hypertonie, der Herzinsuffizienz und der diabetischen Nephropathie erzielt wurden, wird der Schlüsselfunktion von Renin seit Entwicklung des direkten Renin-Inhibitors Aliskiren erstmals auch von therapeutischer Seite Rechnung getragen^{2,11}.

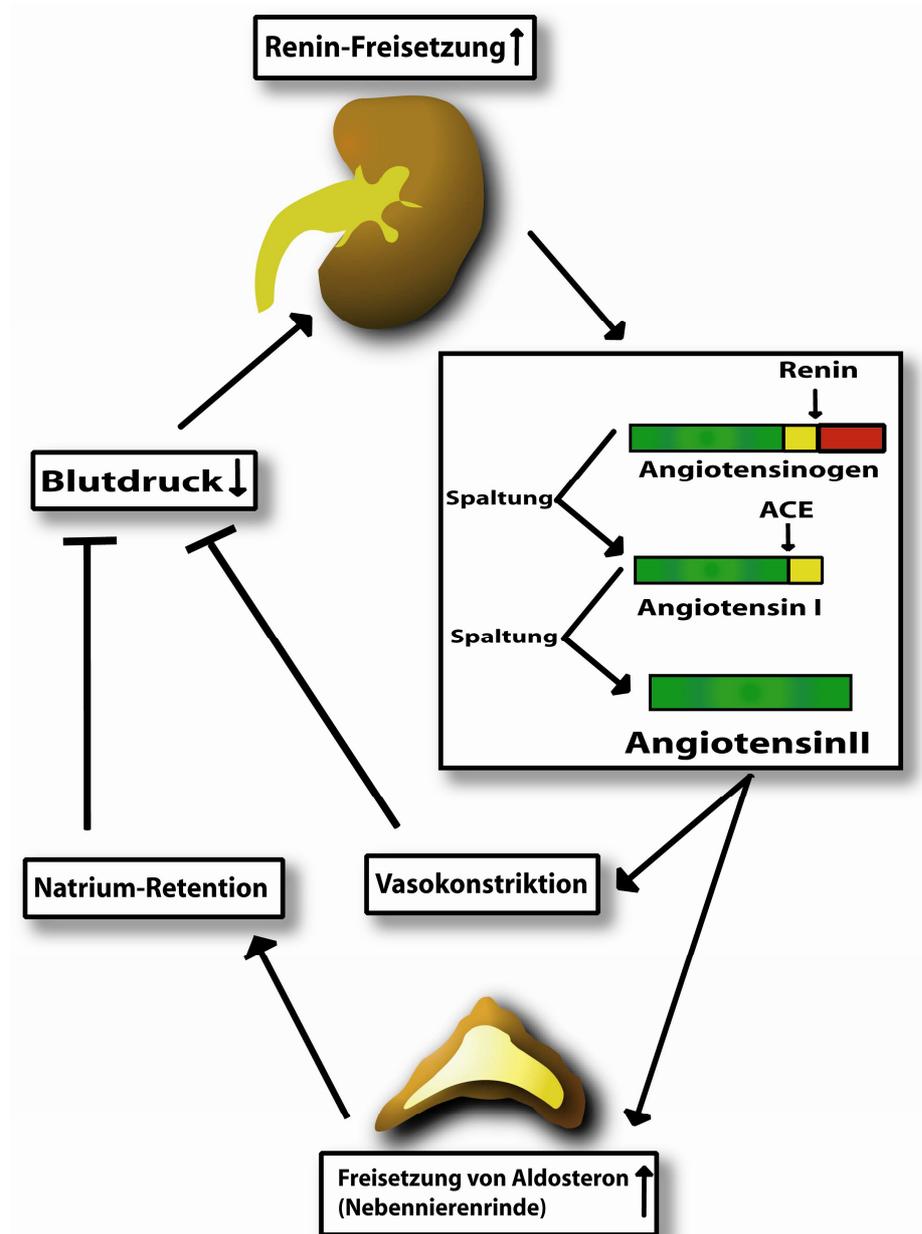


Abbildung 1: Renin-Angiotensin-System. Sinkt der Blutdruck, wird die Freisetzung von Renin in der Niere gesteigert. Nach proteolytischer Spaltung von Angiotensinogen zu Angiotensin I durch die Protease Renin kann Angiotensin I durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) zur aktiven Form Angiotensin II aktiviert werden. Angiotensin II wirkt dem Blutdruckabfall entgegen durch Stimulierung der Aldosteronfreisetzung in der Nebennierenrinde und durch einen direkten vasokonstriktorischen Effekt.

1.2 Renin

1.2.1 Struktur und Funktion

Renin gehört ebenso wie Pepsin, Cathepsin D oder Chymosin zur Gruppe der Aspartylproteasen, wobei es sich gegenüber den anderen genannten Enzymen durch seine sehr hohe Spezifität für sein Substrat Angiotensinogen auszeichnet. Strukturell besteht Renin aus zwei homologen Domänen. Das aktive Zentrum mit zwei gegenüberliegenden Aspartylresten ist in einer Tasche tief in der dazwischenliegenden Spalte verborgen, was einen Teil der Substratspezifität des Enzyms bewirkt¹². Renin wird als inaktives Vorläufermolekül (Prorenin) synthetisiert, in dem ein 43 Aminosäuren langes Propeptid den Zugang für Angiotensinogen zum aktiven Zentrum versperrt. Die Aktivierung des Enzyms kann entweder proteolytisch durch Abspaltung des Propeptids oder nicht-proteolytisch durch eine Konformationsänderung bei Kälteexposition oder niedrigem pH *in vitro* oder, *in vivo*, nach Bindung an den (Pro)renin-Rezeptor erfolgen^{7,13}.

Die enzymatische Aktivität des Renins könnte neben der gezielten pharmakologischen Inhibition auch natürlichen regulatorischen Einflüssen unterliegen. So wurde etwa für polyungesättigte Fettsäuren ein hemmender Effekt beschrieben¹⁴.

1.2.2 Regulation der Freisetzung von Renin

Blutdruck und Salzhaushalt

Das Renin des systemischen RAAS wird in den juxtaglomerulären Zellen (JG-Zellen) der Niere synthetisiert und bei Bedarf sezerniert. Wichtigster Stimulus für die Reninfreisetzung ist ein Abfall des Blutdrucks in der Arteria renalis bzw. den nachgeschalteten Arteriolen der Nierenrinde¹⁵. Für die Messung des Perfusionsdrucks sind dabei mehrere Mechanismen verantwortlich. Diskutiert wird sowohl eine direkte mechanische Hemmung der Reninsekretion in den JG-Zellen durch die Wandspannung der betreffenden Arteriole¹⁶ als auch eine Vermittlung durch den tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus (TGF). Dabei führt eine Erhöhung der Natriumchloridkonzentration an der Macula densa im dicken aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife bei starker renaler Perfusion zu einer Hemmung der Reninsekretion. Da die Natriumchloridkonzentration

im Ultrafiltrat der Nieren auch von der NaCl-Aufnahme mit der Nahrung abhängt, bewirkt auch ein verstärkter Kochsalzkonsum eine Hemmung der Reninfreisetzung über den TGF-Mechanismus^{17,18}. Als Botenstoffe zur Übertragung des Signals von den Macula-densa-Zellen zu den JG-Zellen werden u.a. Adenosin und Prostaglandine diskutiert¹⁹.

Vegetatives Nervensystem, endokrine und parakrine Mechanismen

Das vegetative Nervensystem beeinflusst die Reninsekretion über sympathische Effenzen²⁰. Durch die Bindung des lokal freigesetzten Noradrenalins oder zirkulierender Katecholamine an β 1-Rezeptoren auf den JG-Zellen kommt es intrazellulär zum Anstieg der Konzentration des *second messengers* cAMP, der über die Proteinkinase A die Sekretion des Renins stimuliert²¹.

Daneben hat auch eine Reihe endokrin oder parakrin sezernierter Botenstoffe einen Einfluss auf die Freisetzung von Renin aus den JG-Zellen²². Angiotensin II wirkt dabei Ca^{2+} -vermittelt hemmend im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus^{23,24}, während NO (über einen cGMP-vermittelten Mechanismus)²⁵ und Prostaglandin E2 und I2 (über den cAMP-Weg)²⁶ einen aktivierenden Einfluss zeigen.

Intrazellulär kann cGMP sowohl eine Aktivierung der Reninsekretion über eine Hemmung des Abbaus von cAMP durch die Phosphodiesterase 3A bewirken als auch eine Hemmung der Renin-Freisetzung über die Proteinkinase GII²⁷. Ein Anstieg des intrazellulären Kalziums hat im Gegensatz zu den meisten sekretorischen Zellen in den JG-Zellen eine inhibitorische Wirkung auf die Exozytose²⁸.

Interzelluläre Kommunikation

In den letzten Jahren wurde zudem die entscheidende Rolle der interzellulären Kommunikation der JG-Zellen untereinander sowie mit extraglomerulären Mesangiumzellen durch Gap-junctions für die Regulation der Renin-Freisetzung erkannt. In murinen Knock-out-Modellen für das *gap junction* - Protein Connexin 40 konnte eine erhöhte Plasma-Renin-Aktivität (PRA)²⁹ sowie ein paradoxer Anstieg der Reninsekretion bei steigendem Blutdruck in der Nierenarterie³⁰ gemessen werden. Der Austausch des

Gens für Connexin 43 durch das Gen für Connexin 32 führte im Mausmodell dagegen zu einer Verminderung der Freisetzung von Renin ³¹.

1.2.3 Regulation der Renin-Synthese

Modelle zur Erforschung der Renin-Transkription

Für *in-vitro*-Experimente zur Regulation der Renin-Transkription in der Zellkultur sind bislang verschiedene murine und humane Modelle zum Einsatz gekommen. Die Präparation nativer JG-Zellen aus Mäusenieren ²⁶ oder menschlichem Nierengewebe von Patienten direkt nach Nephrektomie ³² ist mittels eines Trennverfahrens durchführbar, das durch mechanische Filterung und Dichtegradientenzentrifugation Größe und spezifisches Gewicht der JG-Zellen berücksichtigt. Dabei lässt sich jedoch nie eine Verunreinigung mit anderen Zellarten der Niere ganz ausschließen, die artifizielle indirekte Effekte vermitteln könnten. Neben den JG-Zellen sind auch Kulturen humaner Chorionzellen als native, Renin exprimierende Zellpräparationen zum Einsatz gekommen ³³.

Als stabile Zelllinien haben sich in der Erforschung der Renin-Transkription insbesondere die murinen, von einem Nierentumor abgeleiteten AS4.1-Zellen ³⁴ und die humanen Calu6-Zellen ³⁵, die einem Renin produzierenden Lungenkarzinom entstammen, bewährt. Inzwischen sind auch humane HEK293-Zellen als ein geeignetes Modell für Experimente zur Regulation der Renin-Transkription beschrieben worden ³⁶.

In-vivo-Daten konnten durch Erzeugung muriner Knock-out-Modelle mit Deletionen potentieller regulatorischer cis-Elemente ^{37,38} und an transgenen Mausmodellen, die das humane Renin-Gen enthalten ^{39,40}, gewonnen werden.

Cis-Elemente in der Regulation der Renin-Transkription

Die Renin-Gene der Maus und deren regulatorische cis-Elemente

Verschiedene Mäusestämme besitzen ein bzw. zwei Renin-Gene (Ren-1 und Ren-2), die beide auf dem Chromosom 1 lokalisiert sind ⁴¹. Das in allen Stämmen vorhandene Ren-1-Gen wird dabei in Mäusestämmen mit einem Renin-Gen üblicherweise als Ren-1c, in Mäusestämmen mit zwei Renin-Genen als Ren-1d bezeichnet ⁴². Während das Renin der JG-Zellen ein Produkt des Ren-1-Gens darstellt, ist das Ren-2-Gen überwiegend für eine extrarenale Reninexpression, vor allem in den Speicheldrüsen, verantwortlich.

Für das Ren-1c-Gen wurden als stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes gelegene regulatorische Sequenzen experimentell ein proximaler Promotor bei -197bp bis -50bp, ein Enhancer bei -2866bp bis -2625bp und ein CNRE bei -600bp, an das der Transkriptionsfaktor LXR α bindet, identifiziert ⁴³.

Das Renin-Gen des Menschen und seine regulatorischen cis-Elemente

Das humane Renin-Gen liegt ebenfalls auf Chromosom 1 ⁴⁴. Um die Promotoraktivität für das Renin-Gen zu untersuchen, wurden in verschiedenen experimentellen Ansätzen DNA-Fragmente zwischen ca. 100bp und 900bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes verwendet, eine definitionsgemäße Übereinkunft über die Grenze eines proximalen Renin-Promotors beim Menschen existiert nicht ¹⁷. Die Lage eines proximalen Enhancers (Chorion-Enhancer) wurde ursprünglich zwischen -5797bp und -5552bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes angegeben ⁴⁵, neuere Daten sprechen jedoch dafür, dass die funktionell relevante Sequenz sich auf den größeren Bereich zwischen -5870bp und -5279bp erstreckt ^{46,47}. Ein distaler Enhancer, der dem Renin-Enhancer des Ren-1c-Gens der Maus entspricht, liegt bei ca. -11kbp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. Er ist Teil einer 3,9kbp langen, in mehreren Bereichen evolutionär konservierten Region (hREnc-Region) zwischen -14kbp und -11kbp ⁴⁸.

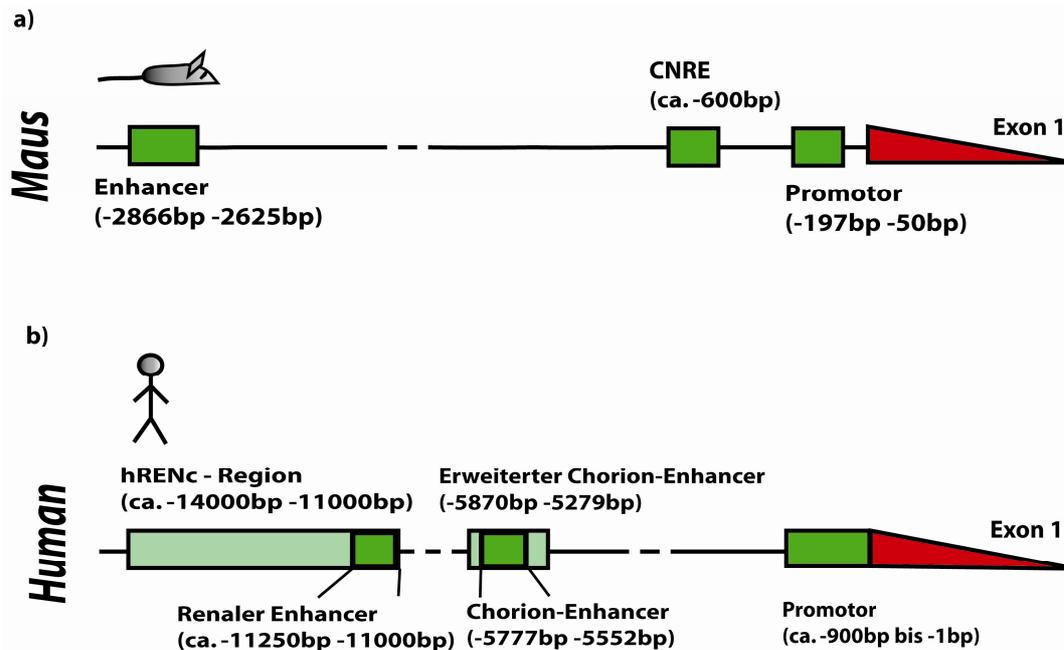


Abbildung 2: Karte der regulatorischen Elemente (grün) stromaufwärts von Exon 1 der Renin-Gene der Maus (a) und des Menschen (b) im Bereich von 0bp bis -3kbp (Maus) und 0bp bis -15kbp (Mensch) im genomischen Kontext. Regulatorische Elemente, für die bereits deutliche experimentelle Evidenz besteht, sind dunkelgrün abgebildet. Die Pfeilspitze weist in Transkriptionsrichtung.

Der Renin-Promotor

Im Gegensatz zu vielen anderen Genen bewirkt der Promotor des Renin-Gens in Reporterassays allenfalls eine geringe Steigerung der Aktivität des Reporterkonstrukts^{49,50}. Dennoch sind oberhalb der bei ca. -30bp gelegenen TATA-Box einige Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in dieser Region lokalisiert, die für die konstitutive und gewebsspezifische Expression des Renin-Gens unerlässlich sind. Besondere Bedeutung kommt hierbei einer HOX/PBX-Bindungsstelle zu (-72bp bis -50bp im murinen Ren-1c-Gen)⁵¹ sowie Bindungsstellen für NF1 und Sp1/Sp3 (im Bereich zwischen -197bp bis -103bp)⁵², die einen hohen Grad an Konserviertheit zwischen Maus, Mensch und Ratte zeigen und für die Renin-Expression unabdingbar sind. Weitere cis-Elemente im proximalen Bereich des Renin-Promotors sind ein cAMP-responsives Element (CRE) sowie Bindungsstellen für COUP-TFII und CBF1⁴³. Beim Menschen wird auch die Wirkung der nukleären Rezeptoren LXR α (über ein CNRE-Element bei -135 bp bis -107 bp)^{32,53} und PPAR γ (über ein Pal3-Motiv bei -148 bp bis -134 bp)^{54,55} über proximale Promotorelemente vermittelt.

Der proximale Renin-Enhancer (Chorion-Enhancer)

Der Chorion-Enhancer wurde als ein zweites wichtiges regulatorisches Element für das Renin-Gen durch Reporterassay-Experimente identifiziert, bei denen in humanen Chorionzellen eine 57-fache Aktivierung des Reporterkonstruktes unabhängig von der Orientierung des Elements gemessen werden konnte ⁴⁵. Als trans-Faktoren, die an den Enhancer binden und seine Wirkung vermitteln, wurden auf der Grundlage von DNase-I-Footprinting-Assays AP-1 und NF-E2 beschrieben. Zweifel an der *in-vivo*-Bedeutung des Elements kamen u.a. auf, da der Chorion-Enhancer evolutionär nicht konserviert ist. In einem transgenen Mausmodell, das ein künstliches Chromosom mit dem humanen Renin-Gen unter Kontrolle des Enhancers bzw. nach dessen Deletion enthält, konnte kein Effekt auf die Expression des humanen Renins nachgewiesen werden ⁴⁰. In der näheren Umgebung des Elements konnte jedoch bei -5312bp ein C/T-Single-Nucleotide-Polymorphismus nachgewiesen werden, bei dem die -5312T-Variante beim Menschen mit einem höheren Blutdruckniveau einhergeht als die -5312C-Variante ⁴⁷. Welche Transkriptionsfaktoren an dieser Stelle binden, ist bislang unklar. Die Vermutung, dass der Effekt durch LF-A1 (wahrscheinlich identisch mit HNF4 ⁵⁶) vermittelt werden könnte, ließ sich bislang nicht bestätigen ⁴⁶.

Der distale Renin-Enhancer (renaler Enhancer)

Im Gegensatz zum Chorion-Enhancer zeigt der renale Enhancer ein hohes Maß an evolutionärer Konserviertheit zwischen Maus, Mensch und Ratte. Nachdem einige transgene Studien die Existenz eines distalen regulatorischen Elements nahe gelegt hatten, wurde der größte Teil der bisherigen *in-vitro*-Befunde anhand des murinen Ren-1c-Gens gewonnen, für das die Lage des Enhancers zwischen -2866 bp und -2625 bp auch erstmals beschrieben wurde ⁵⁰. Im Gegensatz zum schwächeren humanen renalen Enhancer konnte in Reporterassays für den Enhancer der Maus eine ca. 80 bis 100-fache orientierungsunabhängige Aktivierung der Expression des Reportergens gezeigt werden ⁵⁷. Trotz dieser Merkmale eines klassischen Enhancers handelt es sich jedoch eigentlich um ein komplexes regulatorisches Element, das auch für die Vermittlung der inhibitorischen Effekte von Endothelin-1 ⁵⁸, Vitamin D3 ⁵⁹ sowie Zytokinen wie Oncostatin M, IL-6, IL-1 β ⁶⁰ und TNF α ^{61,62} auf die Renin-Transkription eine kritische Rolle spielt.

Im Ren-1c-Enhancer konnten elf Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen identifiziert werden, darunter ein E-box-Motiv, das die Bindung von USF1/USF2 vermittelt ⁴⁹, zwei TGACCT-Motive, die für die Bindung des Retinolsäurerezeptors RAR/RXR ⁶³, des Vitamin-D-Rezeptors und des Waisenrezeptors EAR2 ⁶⁴ verantwortlich gemacht werden, und – als Parallele zum proximalen Promotor – Bindungsstellen für Sp1/Sp3 und NF1 ⁶⁵ sowie ein cAMP-responsive-element (CRE) ⁴⁹. Evidenz für die *in-vivo*-Bedeutung des renalen Enhancers konnte durch ein murines Knock-out-Modell (REKO-Mäuse) gewonnen werden, in dem die Knock-out-Tiere einen erniedrigten arteriellen Mitteldruck, einen verringerten Reningehalt der JG-Zellen und eine Hyperplasie der Macula-densa-Zellen zeigten ⁶⁶. In einem transgenen Mausmodell verringerte ein Knockout des humanen renalen Enhancers die Expression des humanen Renins in den JG-Zellen um einen Faktor von 3 bis 10 ³⁹. Unverändert blieben jedoch die zellspezifische Lokalisation und die Regulierbarkeit der Expression des humanen Renins.

Die hREnc-Region

Unter Verwendung eines Algorithmus, der neben der evolutionären Konserviertheit die Dichte potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen zur Analyse nicht-codierender DNA-Abschnitte einbezieht, konnte für das humane Renin-Gen die hREnc-Region im Bereich zwischen -11kbp und -14kbp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes identifiziert werden ⁴⁸. Innerhalb dieser Region befindet sich auch der renale Enhancer, der bei Anwendung des Algorithmus einen der Bereiche mit besonders hohem Punktwert darstellt, wogegen über die funktionelle Bedeutung anderer Abschnitte der hREnc-Region bislang deutlich weniger bekannt ist. In einer Serie kombinatorischer Reporterassays konnte ein 4,3-facher inhibitorischer Einfluss eines ca. 200bp langen Elementes (CNS4) bei ca. -14kbp gezeigt werden, der in Abwesenheit äußerer Einflüsse durch die noch weiter stromaufwärts gelegenen 600bp moduliert wird ⁶⁷. Experimentelle Evidenz besteht zudem für die funktionelle Bedeutung eines Elements bei ca. -12kbp innerhalb der hREnc-Region, das eine Bindungsstelle für das Wilms-Tumor-Protein (WT1), einen negativen Regulator der Renin-Transkription, enthält ³⁶.

Regulatorische Elemente in Intron1

Mit Hilfe von Reporterassays in HEK293-Zellen und L8-Myoblastenzellen der Ratte konnten auch im Intron1 im Bereich zwischen +159bp und +171bp insgesamt sieben regulatorische Elemente identifiziert werden, die einen überwiegend inhibitorischen Einfluss zeigten^{68,69}. Für diese Elemente wird eine Silencer-Funktion diskutiert, die für die zell- und gewebespezifische Stilllegung des Renin-Gens eine Rolle spielen soll.

Posttranskriptionelle Mechanismen

Neben der Regulation der Renin-Transkription spielen auch posttranskriptionelle Mechanismen bei der Steuerung der Renin-Synthese eine entscheidende Rolle^{17,22,70,71}. Dabei sind sowohl eine Stabilisierung der Renin-mRNA als auch eine Beeinflussung der Translationseffizienz beteiligt. Als RNA-Bindungsproteine, die mit der 3'-UTR der Renin-mRNA interagieren, konnten u.a. hnRNP K und E1, Dynamin, Nucleolin und Y-B1 identifiziert werden⁷². Die Steigerung der RNA-Bindungsaktivität von hnRNP K durch cAMP-abhängige Phosphorylierung dürfte zur Stabilisierung der Renin-mRNA und damit zum Anstieg der zellulären Renin-mRNA-Menge beitragen.

1.3 Der nukleäre Rezeptor HNF4 α

Unter den bisher bekannten Regulatoren der Renin-Transkription spielen nukleäre Rezeptorproteine eine besondere Rolle bei der Steuerung der Transkriptionsaktivität durch metabolische und hormonelle Faktoren. Da der Einfluss eines weiteren Mitgliedes der nukleären Rezeptor-Familie, HNF4 α , auch Gegenstand dieser Arbeit ist, sollen einige Eigenschaften und Funktionen dieses Transkriptionsfaktors an dieser Stelle vorgestellt werden.

1.3.1 HNF4-Zielgene und Pathophysiologie

Als neues Mitglied der Steroidrezeptor-Superfamilie wurde der Transkriptionsfaktor HNF4 erstmals im Jahr 1990 durch seine Bindung an regulatorische Elemente des Transthyretin- und des Apolipoprotein CIII-Gens identifiziert⁵⁶. Inzwischen ist eine Vielzahl von Zielgenen für HNF4 bekannt, die vor allem Gene des Glucose-, Lipid und Aminosäurenmetabolismus^{56,73-75} sowie des Gerinnungssystems^{76,77} umfassen. Auch für virale Gene (Hepatitis B – Virus)⁷⁸ und das Angiotensinogen-Gen⁷⁹ wurde ein regulatorischer Einfluss von HNF4 beschrieben.

Während HNF4 zunächst in Hepatocyten nachgewiesen und als essentiell für deren Differenzierung erkannt wurde⁸⁰, ist inzwischen zudem eine Expression des Transkriptionsfaktors im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas und der Niere, vorwiegend in den Zellen der proximalen Tubuli, gesichert^{81,82}. Im Hinblick auf renale Zielgene von HNF4 konnte bisher ein Einfluss auf den Promotor des Erythropoetin (EPO) – Gens gezeigt werden⁸³. Da für HNF4 bei der Maus bereits in der frühen Embryonalentwicklung eine Expression in entodermalen Geweben, Pankreas und Nierenanlage gezeigt werden konnte, wurde eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors bei der Organogenese angenommen⁸⁴ – eine Vermutung, die durch den Befund unterstützt wird, dass sich Embryonen durch vollständigen HNF4-Knockout im Mausmodell als nicht lebensfähig erwiesen haben⁸⁵.

Eine pathophysiologische Bedeutung von HNF4 ist im Zusammenhang mit dem *Maturity onset diabetes of the young Typ I* (MODY I) bekannt, einer seltenen genetisch bedingten Variante des Diabetes mellitus, die durch eine Mutation des Transkriptionsfaktors oder von HNF4-Bindungsstellen in der Umgebung von Zielgenen des

Glucosestoffwechsels verursacht wird⁸⁶. Auch einige Formen der Hämophilie B sind auf die Mutation von HNF4-Bindungsstellen in der Umgebung des Faktor IX-Gens zurückgeführt worden⁸⁷.

1.3.2 DNA-Bindung und Regulation der HNF4-Aktivität

Der Transkriptionsfaktor HNF4 übt seinen Einfluss auf die mRNA-Synthese über eine Bindung als Homodimer an Bindungselemente mit der Konsensussequenz AGGTCAN(N)AGGTCA aus^{88,89}. Dabei geht von HNF4 eine konstitutive Wirkung auf die Genexpression aus, die Bindung von Liganden an den Faktor stellt also keine zwingende Voraussetzung für seine Basisaktivität dar⁹⁰. Insofern wurde HNF4 lange Zeit als ein Waisenrezeptor ohne Liganden angesehen, eine Regulation seiner DNA-Bindungsaktivität wurde nur durch Interaktion mit anderen Proteinen oder Konkurrenz um identische Bindungsstellen angenommen (COUP-TF, SMRT, SHP, GRIP1, CBP, PPAR α)^{79,91-93}.

Seit die Modulation der regulatorischen Aktivität von HNF4 durch verschiedene Fettsäure-CoenzymA-Thioester beobachtet wurde, ist die Diskussion um Liganden für HNF4 wieder neu entflammt. Dabei konnte vorwiegend für gesättigte Fettsäuren wie die Palmitinsäure eine Steigerung der HNF4-Aktivität beobachtet werden, während polyungesättigte Fettsäuren wie die Linolen-, Eicosapentaen- und Docosahexaensäure die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors abschwächten^{94,95}. Auch durch Röntgenkristallstrukturanalysen konnte die Präsenz von Fettsäuren an der Ligandenbindungsdomäne von HNF4 nachgewiesen werden⁹⁶. Umstritten ist bislang die Frage, ob es sich bei den Fettsäure-CoenzymA-Thioester tatsächlich um klassische austauschbare Liganden handelt oder um Cofaktoren, die bereits bei der Proteinsynthese irreversibel in das HNF4-Molekül eingebaut werden^{90,97}.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der Steuerung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems ist die Regulation der Renin-Transkription durch nicht-codierende cis-Elemente und die an sie bindenden Transkriptionsfaktoren von großem Interesse.

Während die Bedeutung regulatorischer cis-Elemente des Renin-Promotors, des Chori-on-Enhancers und des renalen Enhancers bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, ist noch wenig über die funktionelle Relevanz anderer potentieller regulatorischer Elemente wie der übrigen Abschnitte der hREnc-Region bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher mit Hilfe von Luciferase-Reporterassays die Funktion von vier nicht-codierenden DNA-Fragmenten innerhalb eines bei -13337bp bis -12618bp stromaufwärts des Renin-Gens gelegenen evolutionär konservierten Elementes (PCT3) im Bereich der hREnc – Region näher charakterisiert werden.

Unter den zahlreichen trans-Faktoren, die bisher als Regulatoren der Renin-Transkription identifiziert worden sind, spielen nukleäre Rezeptorproteine wie LXR α/β , PPAR α/γ und RAR/RXR eine besondere Rolle bei der Beeinflussung der Transkription durch metabolische und hormonelle Faktoren^{32,53,54,63}. Nach der bioinformatischen Identifikation potentieller Bindungsstellen stromaufwärts des Renin-Gens sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von HNF4, eines weiteren Mitgliedes der nukleären Rezeptor - Familie, auf regulatorische cis-Elemente des Renin-Gens innerhalb und außerhalb der PCT3-Region ebenfalls mit Hilfe von Luciferase-Reporterassays untersucht werden.

Da für HNF4 beschrieben wurde, dass sich seine DNA-Bindungsaktivität durch verschiedene Fettsäure-CoenzymA-Thioester modulieren lässt⁹⁴, ist auch der Effekt von Fettsäuren auf die Renin-Transkription am Beispiel der Omega3-Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA) in der nativen JG-Zellkultur Gegenstand dieser Arbeit.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
BAC – Fragment - hREnc-500_bisEndBAC_mutter	humanes BAC-Fragment als Template für PCR-Reaktionen	67
pGL3 minProm Adapter I (kurz "minProm")	Firefly-Luciferase-Reporterplasmid mit vorgeschaltetem minimalem Renin-Promotor (-200 bp bis +16 bp)	Hergestellt von Dr. Andreas Steege (AG Mrowka)
pGL3-PCT3	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3 - Region vorgeschaltet	Hergestellt von Dr. Andreas Steege (AG Mrowka)
pGL3-PCT3A	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3B	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3B - Region vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3C	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3C - Region vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3D	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3D - Region vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3Ad1	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d1 vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3Ad2	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d2 vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3Ad3	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d3 vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3Ad4	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d4 vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3Ad5	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d5 vorgeschaltet	diese Arbeit
pGL3-PCT3Ad6	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d6 vorgeschaltet	diese Arbeit

<i>pGL3-PCT3Ad7</i>	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d7 vorgeschaltet	diese Arbeit
<i>pGL3-PCT3Ad8</i>	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d8 vorgeschaltet	diese Arbeit
<i>pGL3-PCT3Ad9</i>	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3A - Region mit Deletion d9 vorgeschaltet	diese Arbeit
<i>pGL3-PCT3Bd1</i>	wie minProm, jedoch zusätzlich PCT3B - Region mit Deletion d1 vorgeschaltet	diese Arbeit
<i>pGL3 pinetProm Adapter I (kurz "-5797bp")</i>	Firefly-Luciferase-Reporterplasmid mit vorgeschaltetem erweitertem Renin-Promotor	Hergestellt aus pGL ₃ -5777 ⁴⁵
<i>pGL3 pinetProm Adapter I_HNFMut2 (kurz "HNF4 A")</i>	wie -5797 bp, jedoch mit Mutation der HNF 4 A - Bindungsstelle	diese Arbeit
<i>pGL3 pinetProm Adapter I_HNFMut3 (kurz "HNF4 B")</i>	wie -5797 bp, jedoch mit Mutation der HNF 4 B - Bindungsstelle	diese Arbeit
<i>pGL3 pinetProm Adapter I_HNFMut5 (kurz "HNF 4 C" + "HRE-like")</i>	wie -5797bp, jedoch mit Mutation der HNF4C- und der „HRE-like“- Bindungsstelle	diese Arbeit
<i>pGL3 pinetProm Adapter I_HNFMut6 (kurz "HRE-like")</i>	wie -5797bp, jedoch mit Mutation der „HRE-like“ - Bindungsstelle	diese Arbeit
<i>pCMV - HNF4S (kurz "HNF4")</i>	Expressionsplasmid für HNF4 (Ratte) unter viralem Promotor	98
<i>pcDNA3.1</i>	leerer Kontrollvektor zu pCMV - HNF4S	Invitrogen
<i>ph-RL-TK</i>	Renilla-Luciferase-Expressionsplasmid	Promega

2.1.2 Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotid	Beschreibung	Sequenz (5' → 3')
<i>PCT3A_FW</i>	FW-Primer zur Amplifikation von PCT3A	TGCAGACGCGTGATTTCCA-GAGGTTGTGGGATCTGA
<i>PCT3A_REV</i>	REV-Primer zur Amplifikation von PCT3A	AGCTAGCCGCGGGCGTCA-CCTCTCGCTCAGGGAAGT

PCT3B_FW	FW-Primer zur Amplifikation von PCT3B	TGCAGACGCGTCCCTGA- GCGAGAGGTGACGC
PCT3B_REV	REV-Primer zur Amplifikation von PCT3B	AGCTAGCCGCGGGGT- GAAGCTGCCAGGAGAGC
PCT3C_FW	FW-Primer zur Amplifikation von PCT3C	TGCAGACGCGTGCTC- TCCTGGCAGCTTACC
PCT3C_REV	REV-Primer zur Amplifikation von PCT3C	AGCTAGCCGCGGTGA- ACTCCCCTACCTGGGGA
PCT3D_FW	FW-Primer zur Amplifikation von PCT3D	TGCAGACGCGTTCCCCAG- GTAGGGGAGTTCACCGCC
PCT3D_REV	REV-Primer zur Amplifikation von PCT3D	AGCTAGCCGCGGTAGCT- GGAAGAGAGAAGCCACACAT
TBd1_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad1	TGCAGACGCGTATCTG- AAGTAAGATGAGAGGG
TBd2-step1_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad2	GCTGGGATCTGACTGGATTT
TBd2-step2_FW	Oligo zur Erzeugung von PCT3Ad2	TGCAGACGCGTGA- TTTCCAGAGGTTGTGGGGCTG- GGATCTGACTGGATT
TBd3P1_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad3	GGGGAAGCATCCTC- TCATCTTACTTCAGAT
TBd3P2_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad3	AGATGAGAGGATGCT- TCCCCTGCCTGGTTC
TBd4P1_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad4	TGGGACGTGAAAATC- CAGTCAGATCCCAGC
TBd4P2_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad4	GACTGGATTTTCACG- TCCCAGCCCTGCCCC
TBd5P1_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad5	CTTTCCCAGCGAACC- AGGCAGGGGAAGCAT
TBd5P2_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad5	TGCCTGGTTCGCTGG- GAAAGGGCTGGGGCA
TBd6P1_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad6	AGGGTCATATGGGGCA- GGGCTGGGACGTGA
TBd6P2_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad6	GCCCTGCCCATATGA- CCCTTCCCTCTGCCCC
TBd7P1_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad7	AGTGGGTGGGTGCC- CCAGCCCTTCCCAGC
TBd7P2_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad7	GGCTGGGGCACCCAC- CCACTCCACTTCCCT

TBd8-step1_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad8	GGCAGAGGGA- AGGGTCATATTG
TBd8-step2_REV	Oligo zur Erzeugung von PCT3Ad8	AGCTAGCCGCG- GGCGTCACCTCTCGCTCGGC- AGAGGGAAGGGTCATATTG
TBd9_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Ad9	AGCTAGCCGCGGAGGG- AAGTGGAGTGGGTGGG
PCT3Bd1P1_REV	Primer zur Erzeugung von PCT3Bd1	AGGACCCTTATTCTGC- CCGGGGTCCAGTTC
PCT3Bd1P2_FW	Primer zur Erzeugung von PCT3Bd1	CCGGGCAGAATAAG- GGTCCTCATACTCTCT
HNF4_1Primer	Primer zur Erzeugung der HNF4_1- („HNF4D“)-Mutation	GACTATGGAATGAAAGCG- CTTGACCTGGCTAAGG
HNF4_2Primer	Primer zur Erzeugung der HNF4_2- („HNF4A“)-Mutation	AGGAATCCAGGAGAACGC- GTCTTTAAAGCAGTCTC
HNF4_3Primer	Primer zur Erzeugung der HNF4_3- („HNF4B“)-Mutation	TAGGCCCTGTACATCTGCA- GGTCTTTTCAGAACAC
HNF4_4Primer	Primer zur Erzeugung der HNF4_4- („HNF4E“)-Mutation	CTCTGTCATCCAGGCCGC- GGTGCAGTGGCACAATC
HNF4_5Primer	Primer zur Erzeugung der HNF4_5- („HNF4C“)-Mutation	AGTCAGGGACAAAGCCC- GGGTTAATATAGAGAATG
HNF4_6Primer	Primer zur Erzeugung der HNF4_6- („HRE-like“)-Mutation	GTAATAAATCAGGGCCGG- CCAGAATTGCAATCACC
mREN_Reg_FW	Real-Time-PCR-Primer für murines Renin	ATGAAGGGGGTGTCTGTGGGGTC <i>(Sequenz von Dr. Vladimir Todorov, Institut für Physiologie, Universität Re- gensburg)</i>
mREN_Reg_REV	Real-Time-PCR-Primer für murines Renin	ATGTCGGGGAGGGTGGGCACCTG <i>(Sequenz von Dr. Vladimir Todorov, Institut für Physiologie, Universität Re- gensburg)</i>
mACT_Reg_FW	Real-Time-PCR-Primer für murines β - Actin	CCGCCCTAGGCACCAGGGTG <i>(Sequenz von Dr. Vladimir Todorov, Institut für Physiologie, Universität Re- gensburg)</i>
mACT_Reg_REV	Real-Time-PCR-Primer für murines β - Actin	GGCTGGGGTGTGAAGGTCTCAAA <i>(Sequenz von Dr. Vladimir Todorov, Institut für Physiologie, Universität Re- gensburg)</i>

2.1.3 Lösungen und Puffer¹

Lösungen und Puffer wurden gemäß nachstehenden Protokollen angefertigt:

10x TBE-Puffer	108g Tris-Base, 55g Borsäure, 40ml EDTA 0,5M gelöst in 1l Wasser; pH auf 8,0 mit HCl oder NaOH eingestellt
Firefly-Luciferase-Substrat	132mg D-Luciferin, 210mg Coenzym A, 5140mg DTT, 292mg ATP, 322mg MgSO ₄ , 3584mg Tricine, 37,2mg EDTA gelöst in 1l Wasser; pH auf 7,8 eingestellt
Ladepuffer (Gelelektrophorese)	30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau
LB-Agarplatten	10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl gelöst in 1l Wasser; pH auf 7,0 mit HCl eingestellt; 15g Agar, 100mg Ampicillin
LB-Flüssigmedium	10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, 100mg Ampicillin gelöst in 1l Wasser; pH auf 7,0 mit HCl eingestellt
Lösung 1 (Regensburg)	50mM KCl, 20mM CaCl ₂ , 1300mM NaCl, 100mM Glucose, 200mM Saccharose, 100mM Tris; pH auf 7,4 eingestellt, steril filtriert
Lösung D (Regensburg)	250g 4M Guanidinium-Thiocyanat, 293ml H ₂ O, 125ml 0,1M Na-Citrat, 26,4ml 10% Sarcosyl
Percoll/NaCl - Lösung (Regensburg)	9/10 Percoll, 1/10 1,5M NaCl; autoklaviert
Renilla-Luciferase-Substrat	64,28g NaCl, 0,8g Na ₂ EDTA, 29,92g K _x PO ₄ , 0,44g BSA, 84mg NaN ₃ , 624µl Coelenterazinlösung (1mg in 1ml Ethanol) in 1l Wasser gelöst; pH auf 5,0 eingestellt

2.1.4 Chemikalien, Kits, Enzyme und Verbrauchsmaterial²

Chemikalien und Verbrauchsmaterial wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Amersham	Percoll (Regensburg)
Biochrom	Penicillin/ Streptomycin
	1M HEPES-Puffer
	200mM 1-Glutamin
	FCS
	Na-Pyruvat

¹ Alle Lösungen und Puffer (außer Luciferase-Substraten und mit Zusatz „Regensburg“) nach ⁹⁹.

² Alle Materialien und Geräte mit Zusatz „Regensburg“ nach ²².

Bioline	PBS Immo-Mix ROX SybrGreen
Biozym Difco	dNTPs Taq-Polymerase Agar Hefeextrakt Trypton
Eppendorf	Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)
Falcon	Reaktionsgefäße (10ml, 50ml)
Fluka	BSA
Greiner	Bione 96-Well-Platten
Invitrogen	Kompetente <i>E. coli</i> SOC-Medium Super Script II cDNA-Synthese-Kit
Merck	Borsäure CaCl ₂ Chloroform EDTA Glucose Guanidinium-Thiocyanat HCl KCl K _x PO ₄ Mercaptoethanol MgSO ₄ Na-Citrat NaCl NaN ₃ Saccharose
New England Biolabs (NEB)	Restriktionsenzyme und -puffer T4 - Ligase
PAA	fettsäurefreies Albumin
PJK	ATP Coelenterazin Coenzym A D-Luciferin DTT
Promega	Passive Lysis Buffer Restriktionsenzyme und -puffer
QIAGEN	QIAEX II Gelextraktions - Kit QIAGEN Miniprep Kit
Roth	Agarose Ethanol Glycerol Isopropanol Na ₂ EDTA NaOH

	Pipettenspitzen Roti-Fect Transfektionsagens SDS Tris Tris-Base
Sarstedt	Pipettenspitzen (Regensburg)
Schott	Reaktionsgefäße (Regensburg) Glaswaren
Sigma-Aldrich	Ampicillin Angiotensin II DEPC Eicosapentaensäure Forskolin Phorbolster TNF α Tricine
Stratagene	Quik Change Multi Site-Directed Mutagenesis Kit
TPP	Zellkulturschalen

2.1.5 Geräte

Geräte von folgenden Herstellern wurden für die Experimente verwendet:

Applied Biosystems	Real-Time-PCR-Gerät "GeneAmp 5700"
Biometra	Spannungsquelle Thermocycler (T1) Thermocycler (T3)
BioRad	Gelelektrophoresekammern Spannungsquelle
Eppendorf	Heizblock Pipetten Zentrifugen
Heraeus	Brutschränke Sterilwerkbank Zentrifugen
Invitrogen	Blaulichttisch "Safe Imager"
Janke & Kunkel	Vortexer
Jouan	Sterilwerkbank (Regensburg)
Labsystems	Luminometer
Perkin Elmer	PCR - Gerät (Regensburg)
Pharmacia	Photometer
Sartorius	Waagen
Scientific Industries	Vortexer (Regensburg)
Sigma	Zentrifugen
Variomag	Magnetprüher
Eigenanfertigung	batteriebetriebene Spannungsquelle für Magnetprüher

2.1.6 Spezialsoftware und Webdienste

Vector NTI (*Invitrogen*) wurde als Software zur Entwicklung der Klonierungsstrategien und für das Primerdesign verwendet.

R (<http://www.r-project.org>) wurde als Software für alle statistischen Berechnungen verwendet.

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Datenbanken des Webdienstes lieferten humane und murine DNA-Sequenzen.

MatInspector (<http://www.genomatix.de>) diente zur bioinformatischen Identifizierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen.

UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>), **ECR Genome Browser** (<http://www.dcode.org>) wurden für Analysen zur evolutionären Konserviertheit potentieller regulatorischer Elemente im Inter-Spezies-Vergleich herangezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung von Reporterplasmiden

Generierung der PCT3A-D – Konstrukte

Klonierungsstrategie (Übersicht)

Die Fragmente *PCT3A*, *B*, *C* und *D* wurden unter Verwendung der entsprechend benannten Primer und des *hRENc – BAC –Fragmentes* als Template durch PCR amplifiziert und die Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt. Die Primer enthielten dabei Überhänge zur Generierung je einer *MluI*- und einer *SacII*-Schnittstelle an den Enden jedes Fragmentes.

Das Vektorplasmid *pGL3-minProm-AdapterI* wurde durch einen Restriktionsverdau mit *MluI* und *SacII* stromaufwärts des Renin-Promotors aufgetrennt und ebenfalls durch Elektrophorese aufgereinigt. Nach Abtrennen der Enden der PCR-Produkte durch einen weiteren Verdau mit *MluI* und *SacII* wurden diese mit dem Vektorplasmid ligiert, die Ligationprodukte in *E.coli* transformiert und diese auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 Stunden wurden für jedes Konstrukt fünf Klone ausgewählt und auf das Vorhandensein des jeweiligen Inserts überprüft. Die Kontrolle auf das Insert erfolgte durch PCR mit den Primern *pGL3sense* und *pGL3antisense*, durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *BanI* (*PCT3A*), *XcmI* (*PCT3B*), *NcoI* (*PCT3C*) und *BglII* (*PCT3 D*) sowie durch DNA-Sequenzierung. Die Plasmide wurden in *E.coli* in einem LB-Ampicillin-Flüssigmedium vermehrt und aus dem *E.coli*-Lysat extrahiert.

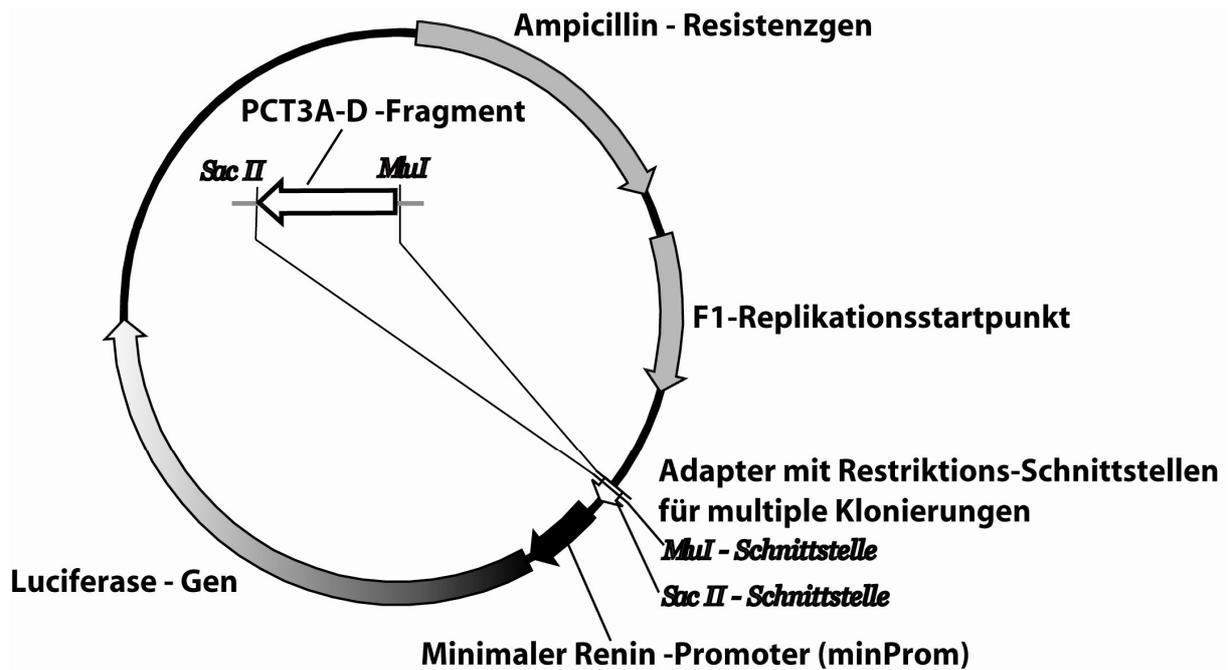


Abbildung 3: Der pGL3-minProm-Adapter I – Reportervektor. Insertion der mittels PCR amplifizierten PCT3A-D-Fragmente nach Restriktionsverdau mit *MluI* und *SacII*.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in Ansätzen zu je 20µl unter Verwendung von 2,5µl dNTPs, 2µl 10x Taq-Polymerase-Puffer, 0,2µl Taq-Polymerase, 5µl Template-Lösung, 2µl Primerlösung (hergestellt aus je 10% Fw- und Rev- Primerstocklösung und 80% H₂O) und 8,3 µl H₂O durchgeführt. Das Protokoll umfasste einen Zyklus von 1min bei 95°C zum Aufschmelzen der DNA zu Beginn, je 30 Zyklen mit den Schritten Denaturierung (95°C, 30s), Primer-Annealing (55°C, 30s) und Elongation (72°C, 30s) sowie eine abschließende Elongationsphase von 10min bei 72°C. Alle Primer für die PCR wurden von der Firma *MWG Biotech* synthetisiert.

Gelelektrophorese und Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Gelelektrophorese erfolgte in 1%-Agarosegelen (0,5g Agarose in 50ml TBE-Puffer mit Zusatz von *SybrSafe*-DNA-Farbstoff nach Herstellerangaben). Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wurde mit Hilfe des *QIAEX II Gel Extraction Kit* nach dem dort angegebenen Standardprotokoll durchgeführt.

Verdau mit Restriktionsenzymen und Ligation

Der Restriktionsverdau wurde in Ansätzen von $x=20\mu\text{l}$, $40\mu\text{l}$ oder $50\mu\text{l}$ durchgeführt, darin enthalten waren $0,5\text{-}3\mu\text{g}$ DNA-Template, je $1\mu\text{l}$ aller beteiligten Restriktionsenzyme, $x/10\mu\text{l}$ Puffer (wie vom Hersteller des Enzyms angegeben) und H_2O zum Auffüllen auf das Gesamtvolumen. Die Ansätze wurden für mindestens 2 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Ligation erfolgte in Ansätzen von $10\mu\text{l}$ mit je $3\mu\text{l}$ (ca. 100ng) aufgeschnittenem Vektorplasmid, $1\mu\text{l}$ (ca. 30ng) Insert, $1\mu\text{l}$ T4-Ligase, $1\mu\text{l}$ 10x Ligase-Puffer, und $4\mu\text{l}$ H_2O . Die Ansätze wurden über Nacht inkubiert bei einer Temperatur von 4°C .

Transformation von Plasmiden in E. coli, Anzucht von E. coli, Plasmidextraktion aus dem E.coli – Lysat

Für die Transformation wurden die Ligationsprodukte zu je 1 Aliquot chemokompetenter E.coli hinzugefügt. Nach einer Inkubation auf Eis für 30min erfolgten ein Hitzeschock bei 42°C für 30s und eine erneute Inkubation auf Eis für 2min. Die Ansätze wurden mit je $250\mu\text{l}$ SOC-Medium aufgefüllt und für 45min bei 37°C im Thermoblock geschüttelt (300rpm). Die transformierten E. coli wurden auf Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und diese nach Trocknen bei 37°C bebrütet. Die Anzucht von E. coli in der Flüssigkultur erfolgte in einem LB-Flüssigmedium bei 37°C unter Schütteln im Brutschrank.

Die Isolation der Plasmide aus der E.coli – Flüssigkultur wurde mit Hilfe des *QIAprep Miniprep Kit* nach dem dort angegebenen Standardprotokoll durchgeführt.

DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzanalysen wurden von der Firma *Eurofins-MWG* durchgeführt.

Generierung der Deletionskonstrukte PCT3Ad1-d9 und PCT3Bd1

Zur Erzeugung von Deletionen innerhalb des PCT3A – Fragmentes wurde eine Strategie mit Anwendung von zwei kombinierten PCR-Reaktionen entwickelt. Im ersten Schritt

kamen Primer zum Einsatz, die in Polymerase-Syntheserichtung aus je ca. 20 Basenpaaren vor der und 10 Basenpaaren hinter der zu deletierenden Sequenz bestanden, in denen die zu deletierende Sequenz selbst jedoch ausgespart war.

So wurden etwa zur Erzeugung der Deletion D3 ein D3-P2-Fw-Primer und ein D3-P1-Rev-Primer erstellt, die jeweils die gewünschte Deletion enthielten. In einer PCR-Reaktion mit dem D3-P2-Fw-Primer und dem PCT3A-Rev-Primer sowie einer Reaktion mit dem D3-P1-Rev-Primer und dem PCT3A-Fw-Primer wurden vom PCT3A – Template zwei verschiedene PCR-Produkte (D3-P1 und D3-P2) erzeugt, die den Sequenzbereich zwischen je einem Ende des PCT3A – Fragmentes und der Umgebung der gewünschten Deletion umfassten.

In einer zweiten PCR wurden die Produkte P1 und P2 an ihrer überlappenden Sequenz von ca. 20bp zusammengeführt und mit den Primern PCT3A – Fw und PCT3A –Rev amplifiziert.

Eine analoge Strategie kam zur Erzeugung der HNF4–Bindungsstellendeletion PCT3Bd1 zum Einsatz.

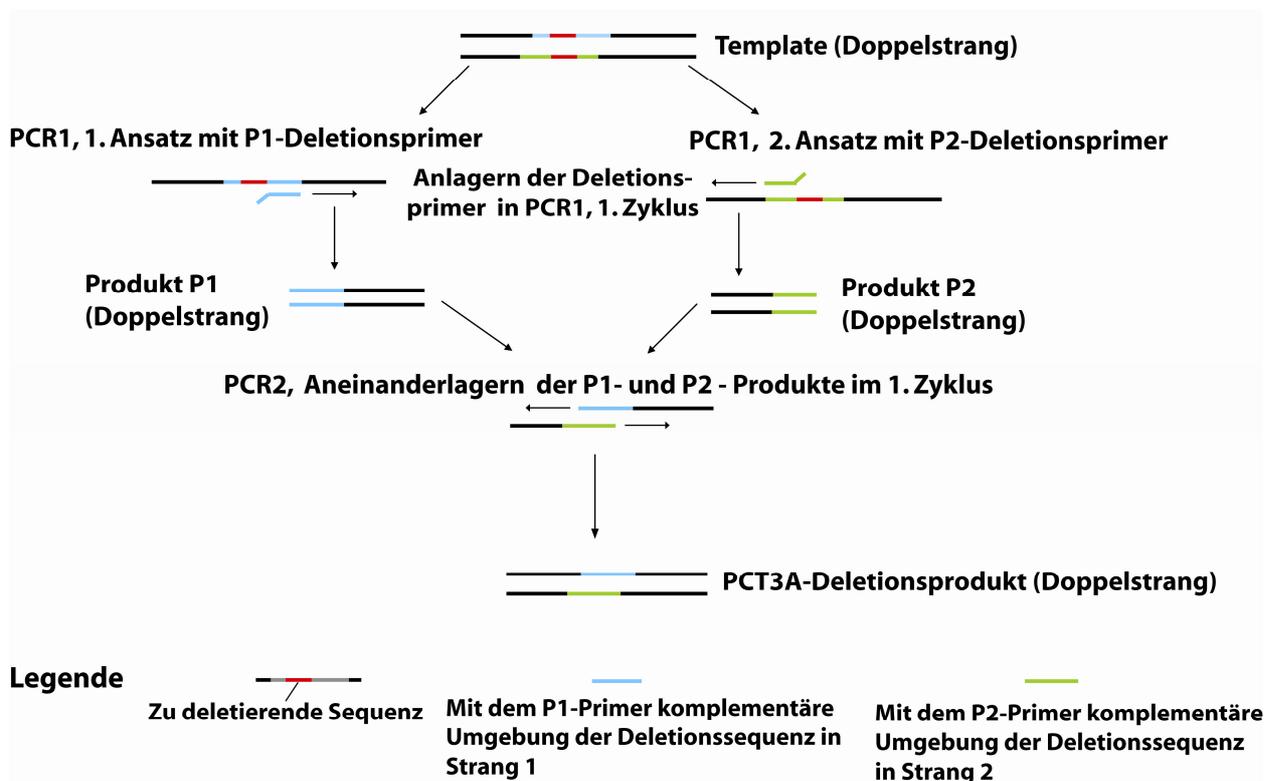


Abbildung 4: Strategie zur Erzeugung der PCT3A- und PCT3B-Deletionen mittels PCR

Im Einzelnen wurden für die PCT3A-Deletionen für den ersten Schritt 14 PCRs mit dem PCT3A – Fragment als Template durchgeführt.

PCR	Primer 1	Primer 2
1	<i>TBd1_FW</i>	<i>PCT3A_REV</i>
2	<i>TBd2-step1_FW</i>	<i>PCT3A_REV</i>
3	<i>TBd3P1_REV</i>	<i>PCT3A_FW</i>
4	<i>TBd3P2_FW</i>	<i>PCT3A_REV</i>
5	<i>TBd4P1_REV</i>	<i>PCT3A_FW</i>
6	<i>TBd4P2_FW</i>	<i>PCT3A_REV</i>
7	<i>TBd5P1_REV</i>	<i>PCT3A_FW</i>
8	<i>TBd5P2_FW</i>	<i>PCT3A_REV</i>
9	<i>TBd6P1_REV</i>	<i>PCT3A_FW</i>
10	<i>TBd6P2_FW</i>	<i>PCT3A_REV</i>
11	<i>TBd7P1_REV</i>	<i>PCT3A_FW</i>
12	<i>TBd7P2_FW</i>	<i>PCT3A_REV</i>
13	<i>TBd8-step1_REV</i>	<i>PCT3A_FW</i>
14	<i>TBd9_REV</i>	<i>PCT3A_FW</i>

Tabelle 1: Primerpaarungen in Schritt 1 zur Erzeugung der Deletionen PCT3Ad1-d9

Reaktion 1 und 14 lieferten bereits die PCT3Ad1 und PCT3Ad9 – Produkte (endständige Deletionen).

Für die PCT3Bd1 – Deletion wurden im ersten Schritt zwei PCRs mit den Primerpaarungen PCT3Bd1P1_REV und PCT3B_FW sowie PCT3Bd1P2_FW und PCT3B_REV durchgeführt.

In Schritt 2 wurden zur Erzeugung der übrigen PCT3A – Deletionen (d2-d8) 7 PCRs und zur Erzeugung der PCT3B – Deletion eine PCR unter gleichzeitiger Verwendung der P1 – Produkte und der P2 - Produkte als Template und der PCT3A – Primer bzw. PCT3B – Primer durchgeführt. Zur Erzeugung der Deletionen PCT3Ad2 und d8 wurden die Produkte aus Reaktion 2 bzw. Reaktion 13 zusammen mit den synthetisch hergestellten Oligos d2-step2 und d8-step2 (MWG Biotech) als Template verwendet. PCR-Ansätze und Reaktionsbedingungen erfolgten entsprechend dem oben beschriebenen Protokoll, jedoch mit einer Annealing-Temperatur von 50°C.

Die in Schritt 2 gewonnenen PCR-Produkte wurden entsprechend der oben beschriebenen Strategie in den *pGL3-minProm-Adapter I* - Vektor eingefügt und in E.coli vermehrt.

Generierung der Mutationskonstrukte HNF4A-C und HRE-like

Die Mutationskonstrukte HNF4A-C und „HRE-like“ wurden mit Hilfe des *QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* nach dem dort angegebenen Protokoll erzeugt. Im Einzelnen wurde die Mutagenese-PCR in drei verschiedenen Ansätzen mit den Mutagenese-Primern HNF4_1/HNF4_2 (Ansatz 1), HNF4_3/HNF4_4 (Ansatz 2) und HNF4_5/HNF4_6 (Ansatz 3) und dem pGL3-pinetProm-AdapterI-Vektor als Template (Ansatz 1-3) unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Dabei waren die Sequenzen der Mutationsprimer so gewählt, dass durch die Mutationen neben der Veränderung der Core-Sequenz der potentiellen HNF4-Bindungsstellen auch die Erzeugung einer neuen Restriktions-Schnittstelle bewirkt wurde. Das weitere Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Eine Überprüfung der gewonnenen Plasmide auf das Vorhandensein der Mutationen wurde durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *AfeI* (HNF4_1 = „HNF4D“), *MluI* (HNF4_2= „HNF4A“), *PstI* (HNF4_3 = „HNF4B“), *SacII* (HNF4_4 = „HNF4E“), *SmaI* (HNF4_5 = „HNF4C“) oder *FseI* (HNF4_6 = „HRE-like“) vorgenommen und durch eine Sequenzanalyse bestätigt. Im einzelnen gingen von allen theoretisch möglichen Mutationskonstrukten aus Ansatz 1 ein Plasmid mit der HNF4C-Mutation, aus Ansatz 2 ein Plasmid mit der HNF4B-Mutation und aus Ansatz 3 ein Plasmid mit der „HRE-like“-Mutation sowie ein Plasmid mit beiden möglichen Mutationen („HRE-like“- und HNF4C-Mutation) hervor, die für die Luciferase-Assays eingesetzt wurden.

2.2.2 Luciferase – Reporterassays

Kultur der HEK 293 – Zellen

Alle Luciferase-Reporterassays wurden mit HEK293 – Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden in DMEM – High glucose – Medium mit Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FCS), 1mmol/l HEPES – Puffer, 2mmol/l Glutamin, 50U/ml Penicillin und 50µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte bei mikroskopisch konfluierendem Plattenbesatz nach ca. 3-4 Tagen mit einer Verdünnung von 1:6. Nach 2-3 Passagen nach dem Auftauen wurden die Zellen für Transfektionen genutzt.

Transfektion und Stimulation der HEK293 – Zellen

Für die Transfektion wurden die HEK293-Zellen auf eine 96Well – Platte passagiert und über Nacht im Zellkulturschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Austausch des Zellkulturmediums durch ein sonst identisches Medium ohne FCS-Zusatz mit 75µl/Well. Die DNA wurde mit dem Transfektionsagens (Roti-Fect) in einem Verhältnis von 1:4 (1µg DNA/1µl Transfektionsagens) komplexiert. Dazu erfolgte die Zugabe von DNA und Transfektionsagens zu einem Komplexbildungsmedium (HEK293 – Kulturmedium ohne Penicillin, Streptomycin und FCS) sowie anschließendes Vortexen und eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30min. Anschließend wurden je Well 75µl dieses DNA-Komplexes mit einem DNA – Gehalt von 100ng pro eingesetztem Vektorplasmid zugefügt und die Zellen bis zur Messung für 24 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert.

Für die Stimulationen wurde 24 Stunden nach der Transfektion das Medium durch 75µl/Well eines HEK293 – Kulturmediums mit der gewünschten Konzentration der jeweiligen Stimulantien ersetzt. Die Messung erfolgte nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Zellkulturschrank.

Lyse der Zellen und Messung im Luminometer

24 Stunden nach Transfektion oder Stimulation der Zellen wurden das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen durch Zugabe von 30µl/Well Passive Lysis Buffer (*Promega*) lysiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Messung zunächst der Firefly- und daraufhin der Renilla-Luciferaseaktivität im Luminometer.

2.2.3 Untersuchungen zum Renin-mRNA-Gehalt in der JG-Zellkultur

Herstellung von Eicosapentaensäure-Albuminlösung

Die Behandlung der Zellen mit Eicosapentaensäure erfolgte durch Zugabe einer 5mM Eicosapentaensäure-Albuminlösung in der für die jeweilige Endkonzentration gewünschten Menge zu JG-Zellkulturmedium. Zur Herstellung der Eicosapentaensäure-Albuminlösung wurde Eicosapentaensäure in Ethanol (100%) gelöst und in dieser Form mit einer 12,5%-Lösung von fettsäurefreiem Albumin in PBS durch langsames Rühren

für 15-20 Stunden unter hypoxischen Bedingungen (Hypoxieschrank mit N₂-Atmosphäre) komplexiert.

Die fettsäurefreie Kontrolllösung wurde nach einem identischen Protokoll unter Verwendung von Ethanol ohne Fettsäurezusatz hergestellt.

JG-Zellpräparation, Zellkultur und Stimulation der Zellen

Alle JG-Zellpräparationen und die dafür erforderlichen Tötungen der Mäuse wurden am Institut für Physiologie der Universität Regensburg durchgeführt. Für die Präparation nativer JG-Zellen wurde jeweils eine Maus durch Narkose mit Sevofluran und Genickbruch getötet, die Nieren entnommen, von der Kapsel befreit und zerkleinert. Das Nierengewebe wurde in einer Verdauungslösung (35ml Lösung 1, 54 mg Kollagenase, 75 mg Trypsin) in einem Wasserbad bei 37°C unter Rühren für 60-90min inkubiert und anschließend durch einen Nylonfilter (22,4 µm Porengröße) gegeben. Der Durchfluss wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (7min bei 2200rpm) und Resuspendieren in Lösung 1 gewaschen, die pelletierten Zellen in 2ml Lösung 1 aufgenommen und mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgetrennt. Dazu wurden 19ml Lösung 1 und 9ml Percoll/NaCl – Lösung in einen Sorvallbecher gefüllt, anschließend die Zellsuspension zugegeben und für 30min bei 11000rpm und 4°C zentrifugiert. Von den dabei entstehenden Zellschichten wurde die zweite Phase isoliert abgenommen, die Zellen in Lösung 1 gewaschen und in 24ml JG-Zellkulturmedium (DMEM mit 2,5 ml L-Glutamin (200 mmol/l), 2,5 ml Na-Pyruvat (100 mmol/l), 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin sowie 5% FCS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine 96 Well – Platte (100µl/Well) verbracht und über Nacht im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Behandlung der Zellen mit Eicosapentaensäure-Lösung erfolgte nach 24 Stunden durch Auswechseln des Mediums durch ein JG-Zellkulturmedium mit Zusatz von EPA-Albuminlösung in der für die gewünschte Endkonzentration erforderlichen Menge. Nach der Stimulation wurden die Zellen bis zur Isolierung der RNA erneut für 24h im Zellkulturschrank inkubiert.

Isolation der mRNA und Reverse Transkription

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Methode. Dazu wurden nach Entfernen des Zellkulturmediums die Zellen pro Well in 400µl Lösung D mit Mercaptoethanol (50ml Lösung D/360µl Mercaptoethanol) aufgenommen, mit 2µl tRNA, 40µl 2M Na-Acetat (pH4), 400µl wassergesättigtem saurem Phenol (pH4) und 80µl Chloroform versetzt, für 15min auf Eis inkubiert und für 20min bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert. 400µl der entstandenen oberen Phase wurden mit 400µl 100% Isopropanol vermischt und die Lösung für 60-90min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugieren für 20min bei 12000 rpm und 4°C wurde das entstandene RNA-Pellet in 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 9µl DEPC-Wasser gelöst.

Für die cDNA – Synthese mit Hilfe des *Super Script II - Kit* wurde die RNA mit 1 µl Oligo-dT₁₂₋₁₈ versetzt, für 5min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis verbracht. Nach Zugabe von 1µl reverser Transkriptase, 4µl RT-Puffer und 4µl dNTPs erfolgte die Reverse Transkription bei 37°C für 1 Stunde mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 95°C für 2 min.

Quantifizierung der Renin-mRNA mittels Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der Renin-mRNA erfolgte durch Real-Time-PCR in Ansätzen von insgesamt 25µl (2µl cDNA, 12,5 µl Immo-Mix, 0,5µl SybrGreen, 2,5µl ROX, 2µl Primer-Mix (bestehend aus je 10% FW- und REV-Primerstocklösung und 80% H₂O) sowie 5,5µl H₂O). Für die Renin-Reaktion wurden die Primer *mREN_Reg_FW* und *mREN_Reg_REV* eingesetzt, zur Quantifizierung des Housekeeping-Gens β -Actin die Primer *mACT_Reg_FW* und *mACT_Reg_REV*. Das Protokoll umfasste einen Inkubationsschritt von 2min bei 50°C zum Aktivieren der Polymerase, eine weitere Inkubation von 10min bei 95°C zum Aufschmelzen der DNA sowie 40 Zyklen von je 15s bei 95°C (Denaturierung), 30s bei 62°C (Annealing) und 60s bei 72°C (Elongation). Die Auswertung erfolgte mittels relativer Standardkurven auf der Grundlage einer Verdünnungsreihe je einer Probe. Alle Messungen wurden mit Dreifachansätzen durchgeführt, die Identität der Produkte wurde durch Erstellen einer Schmelzkurve überprüft.

2.2.4 In-silico-Analysen

Transkriptionsfaktorbindungsstellen

Alle Transkriptionsfaktor – Bindungsstellenanalysen wurden mit MatInspector (*Genomatix*) unter Verwendung von Standardeinstellungen durchgeführt.

Evolutionäre Konserviertheit

Die Analysen zur evolutionären Konserviertheit von nicht-codierenden-DNA-Abschnitten wurden mit Hilfe des *ECR Genome Browser* unter Verwendung von Standardeinstellungen (Mindestlänge für evolutionär konservierte Regionen > 100bp, minimale Sequenzübereinstimmung ca. 70%) durchgeführt.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde nach statistischer Beratung durch Dr. Konrad Neumann (Institut für Biometrie, CCM) mittels Varianzanalyse (ANOVA) vorgenommen. Bei Nichtvorliegen der Voraussetzungen für eine ANOVA kamen nichtparametrische Testverfahren zum Einsatz (Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgenden Post-Hoc-Paarvergleichen durch den Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben). Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm „R“ durchgeführt.

Evolutionäre Konserviertheit

Mit Hilfe des *ECR Genome Browser* wurde eine Analyse des evolutionären Konservierungsgrades der PCT3-Region durchgeführt. Vor allem für den Teilabschnitt PCT3A lässt sich dabei ein hohes Maß an evolutionärer Konserviertheit mit einer mittleren Übereinstimmung von 68,4% zwischen humaner und muriner Sequenz erkennen (Abbildung 6).

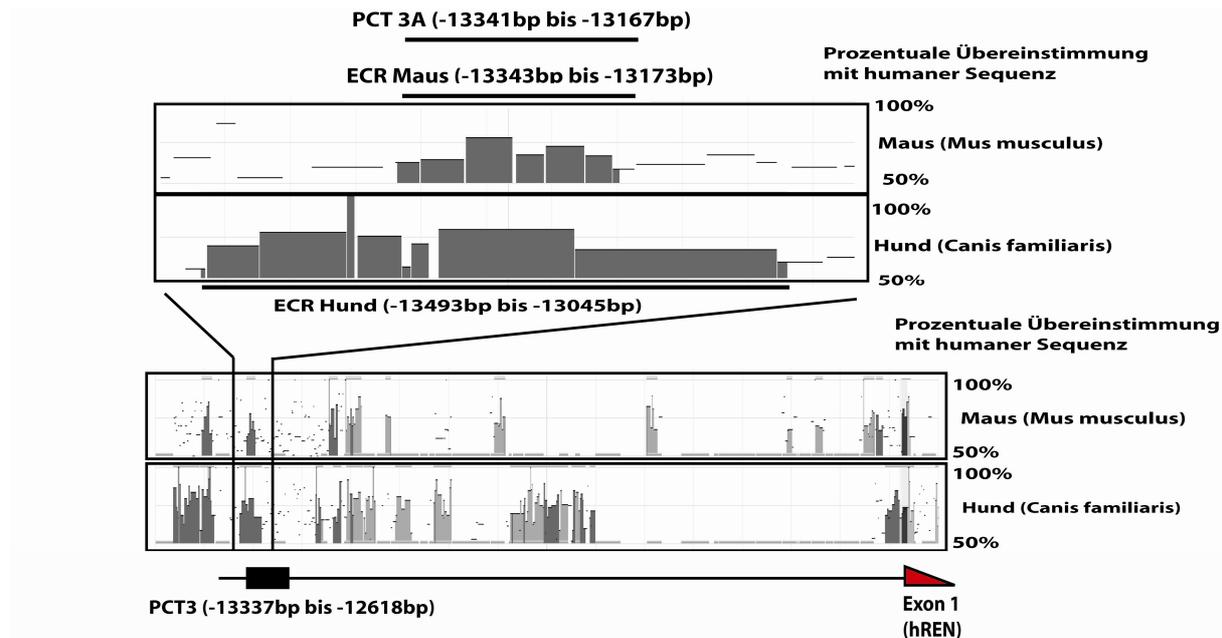


Abbildung 6: Evolutionäre Konserviertheit der PCT3-Region (adaptierte Darstellung nach dem *ECR Genome Browser*). Alle Positionsangaben (x-Achse) beziehen sich auf Entfernungen stromaufwärts des humanen Renin-Gens. Die evolutionäre Konserviertheit ist für Maus (oben) und Hund (unten) jeweils als prozentuale Übereinstimmung mit der humanen Sequenz angegeben. Bei Verwendung der Standardeinstellungen ergibt sich für den Sequenzvergleich Maus-Mensch ein konserviertes Element (ECR Maus; 68,4% mittlere Sequenzidentität), das nahezu deckungsgleich mit dem PCT3A-Fragment ist. Für den Sequenzvergleich Hund-Mensch ergibt sich ein evolutionär konserviertes Element (ECR Hund; 72,2% mittlere Sequenzidentität), das das PCT3A-Fragment ebenfalls vollständig einschließt.

Potentiell relevante Transkriptionsfaktor – Bindungsstellen im PCT3A-Fragment

Innerhalb des evolutionär besonders stark konservierten PCT3A-Elementes wurde eine Analyse potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen mit *MatInspector* unter Standardeinstellungen durchgeführt.

Bezüglich bereits in der Regulation des Renin-Gens bekannter Transkriptionsfaktoren ergaben sich zwei potentielle cAMP-responsive-element (CRE)–Bindungsstellen, drei RXR-Motive, zwei SP1–Motive, ein WT1 (Wilms-Tumor-Suppressor)–Bindungsmotiv und ein Pal3 (PPAR γ) – Bindungsmotiv (Abbildung 7).

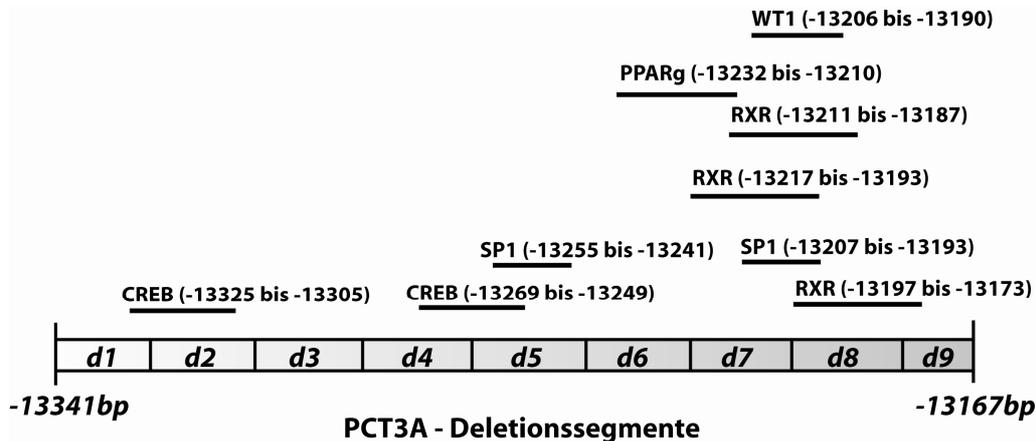


Abbildung 7: Potentielle Transkriptionsfaktor–Bindungsstellen innerhalb der PCT3A–Region. Dargestellt sind nur Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, die bereits als Regulatoren der Renin-Transkription bekannt sind. Alle Positionsangaben beziehen sich auf Entfernungen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des Renin–Gens. Die Abschnitte d1 bis d9 beziehen sich auf die Lage der Deletionsfragmente entsprechend Abschnitt 3.1.2.

3.1.2 Luciferase-Reporterassays

Einfluss der Teilregionen PCT3A-D auf den Renin-Promotor unter Stimulation mit Mediatoren der Renin – Transkription (Forskolin, Angiotensin II, TNF α , Phorbol ester)

Zur experimentellen Überprüfung eines Einflusses der PCT3–Region auf den Renin-Promotor wurden Reporterplasmide generiert, die neben dem minimalen Renin-Promotor (minProm, -201 bp bis +16 bp stromaufwärts des Renin-Gens) die 720 Basenpaare der PCT3–Region bzw. deren Teilstücke PCT3A bis PCT3D enthielten. Der minimale Renin-Promotor wurde dabei dem Firefly-Luciferase-Gen, die jeweilige PCT3–Teilsequenz dem minProm direkt vorgeschaltet (Abbildung 8).

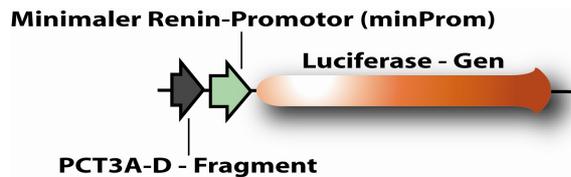


Abbildung 8: Aufbau der Reporterkonstrukte PCT3A bis PCT3D. In den pGL3-minProm-Adapter I – Reportervektor (Abbildung 3) wurden der humane minimale Renin-Promotor und, diesem direkt vorgeschaltet, eines der Fragmente PCT3A bis PCT3D integriert. Die Pfeile weisen in Transkriptionsrichtung des Luciferase-Gens.

Die Reporterkonstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert, die Zellen nach 24 Stunden unter sechs verschiedenen Bedingungen stimuliert (Behandlung mit Forskolin, Angiotensin II, TNF α , Phorbol ester, Ethanol und Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze als Kontrolle) und die Firefly-Luciferaseaktivität nach weiteren 24 Stunden im Lumino meter gemessen. Um einen möglichen Einfluss unterschiedlicher Transfektionseffizienzen zu eliminieren, wurden die Zellen mit einem konstitutiv exprimierten Expressionsplasmid für die Renilla-Luciferase co-transfiziert und die Messwerte als Quotient Firefly / Renilla-Luciferase-Aktivität angegeben.

In den Kontrollen ohne Stimulanzienzusatz zeigte sich ein aktivierender Effekt der PCT3A (3,3-fach) -, PCT3 (2,3-fach) -, PCT3B (1,4-fach) - und PCT3D (1,3-fach) - Regionen auf den minProm. Der minProm wurde unter Zusatz von TNF α 3,4-fach und unter Zusatz von Angiotensin II 1,4-fach aktiviert. Unter Zusatz von Phorbol ester war die Promotoraktivität 0,6-fach abgeschwächt.

Einen Überblick über die Ergebnisse gibt Abbildung 9; in Abbildung 10 sind Interaktionen zwischen den vorgeschalteten PCT3-Teilfragmenten und den Versuchsbedingungen dargestellt.

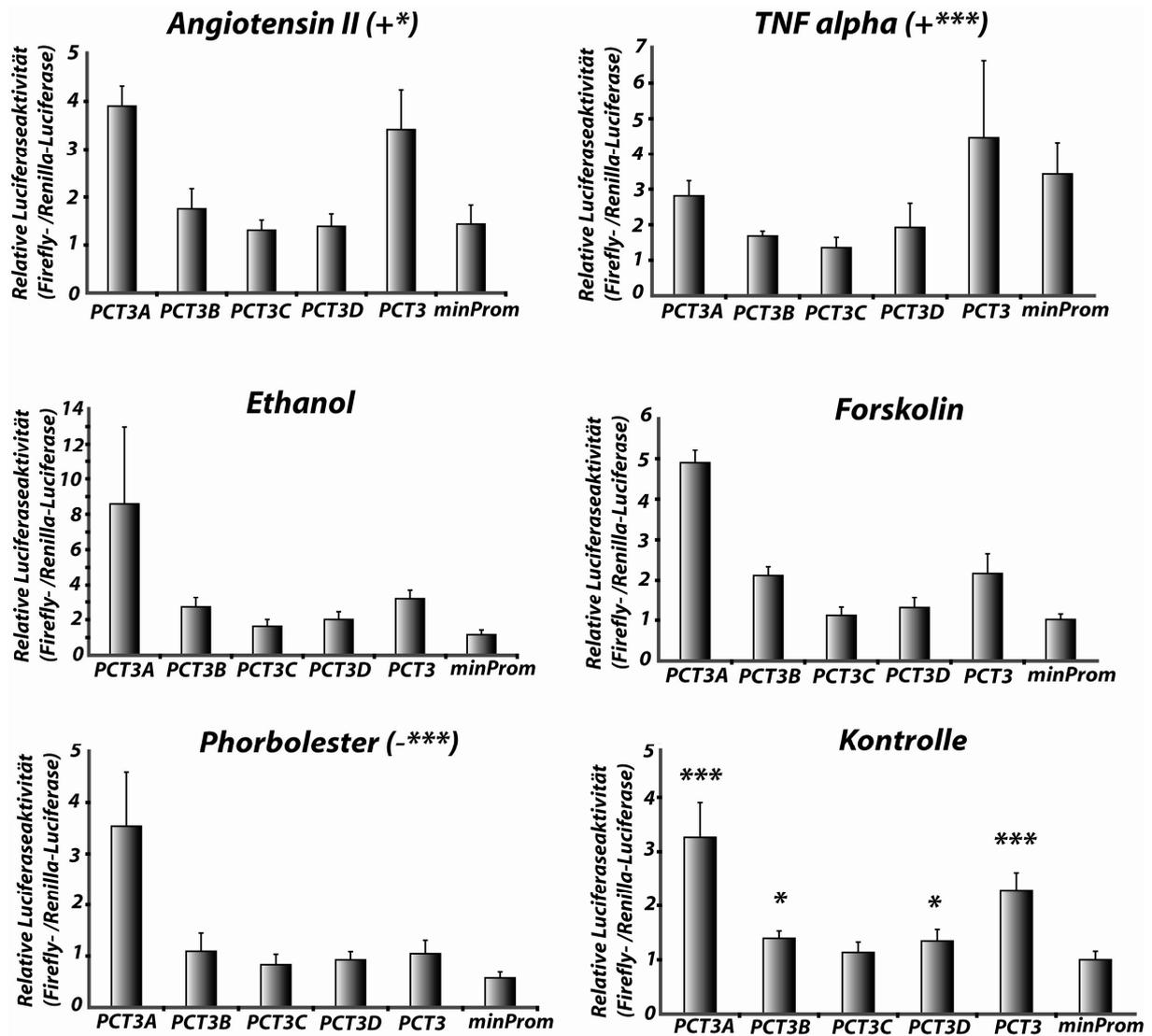


Abbildung 9: Relative Luciferaseaktivität (Firefly- /Renilla-Luciferase) 48 Stunden nach Transfektion von HEK293-Zellen mit den PCT3 – Reporterkonstrukten und einem konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferaseplasmid. Die Behandlung mit den Mediatoren Forskolin (10µmol/l), Phorbol ester (100nmol/l), TNFα (10µg/l) und Angiotensin II (100nmol/l) sowie mit Ethanol (0,1%) als Lösungsmittelkontrolle wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Darstellung als Mittelwerte +/- Standardabweichung, signifikante Unterschiede der Stimulationen zur Kontrolle und der PCT3-Konstrukte zum minProm-Konstrukt (nur im Diagramm "Kontrolle") sind mit * gekennzeichnet. Die angegebenen signifikanten Effekte von Angiotensin II, TNFα und Phorbol ester beziehen sich auf das minProm-Konstrukt. (Irrtumswahrscheinlichkeit p: *<0,05; **<0,01; ***<0,001; n=5).

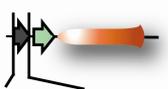
 Konstrukt	Stimulation				
	AngiotensinII	TNFalpha	Ethanol	Forskolin	Phorbolester
PCT3A		⊖ (***)	⊕ (***)		⊕ (**)
PCT3B		⊖ (***)	⊕ (*)		
PCT3C		⊖ (***)			
PCT3D		⊖ (***)			
PCT3		⊖ (**)			

Abbildung 10: Einfluss der Behandlung mit Angiotensin II, TNF α , Ethanol, Forskolin und Phorbolester auf den Effekt der PCT3A-D-Fragmente auf den minimalen Renin-Promotor. Die Verstärkung eines positiv stimulierenden Effektes der Konstrukte ist mit „+“, die Abschwächung eines positiv stimulierenden Effektes oder Erzeugung eines hemmenden Einflusses ist mit „-“ gekennzeichnet. Statistische Signifikanz der Effekte: Irrtumswahrscheinlichkeit p * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $<0,001$.

Deletion von ca. 20bp umfassenden Teilfragmenten des PCT3A-Elementes

Um eine genauere Eingrenzung der Bereiche innerhalb des PCT3A-Elementes zu erlauben, die für den Effekt der Region auf den Renin-Promotor verantwortlich sind, wurden neun Reporterplasmide generiert, die dem PCT3A-Plasmid entsprachen, die jedoch Deletionen von jeweils ca. 20bp innerhalb der PCT3A-Region aufwiesen (Abbildung 11). Auch diese Plasmide wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Luciferase-Aktivität nach 24 Stunden gemessen.

In diesem Ansatz konnte für die PCT3-Region ein 2,1-facher aktivierender Effekt auf den Renin-Promotor, für den isolierten PCT3A-Abschnitt ein 8-facher aktivierender Effekt auf den Renin-Promotor gemessen werden. Die Deletionskonstrukte zeigten eine 4-fache (PCT3Ad5) bis maximal 6,5-fache (PCT3Ad1) aktivierende Wirkung auf den Renin-Promotor. Dabei war der Effekt aller Deletionskonstrukte signifikant geringer ausgeprägt als der Effekt des vollständigen PCT3A – Elementes (Abbildung 12).

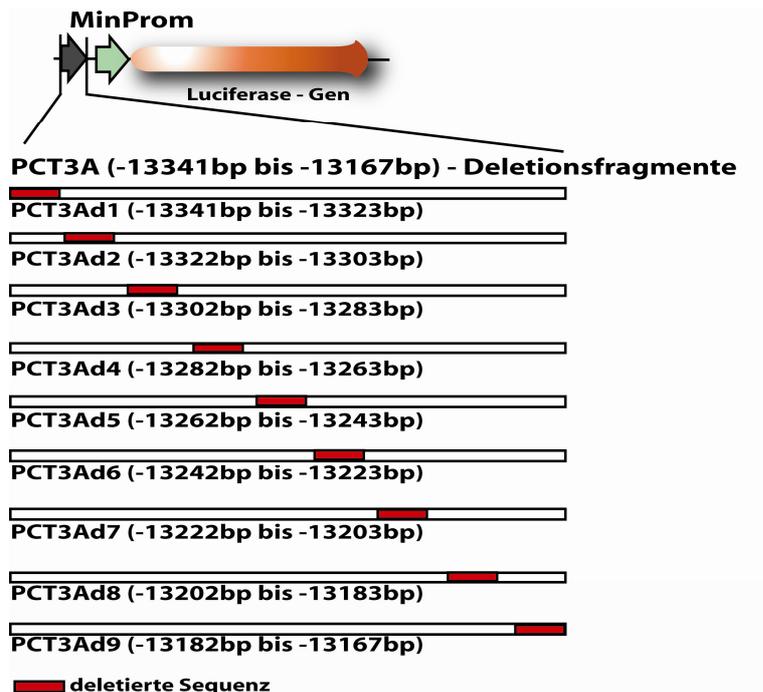


Abbildung 11: PCT3A–Deletionskonstrukte. Alle Positionsangaben beziehen sich auf Entfernungen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des Renin – Gens.

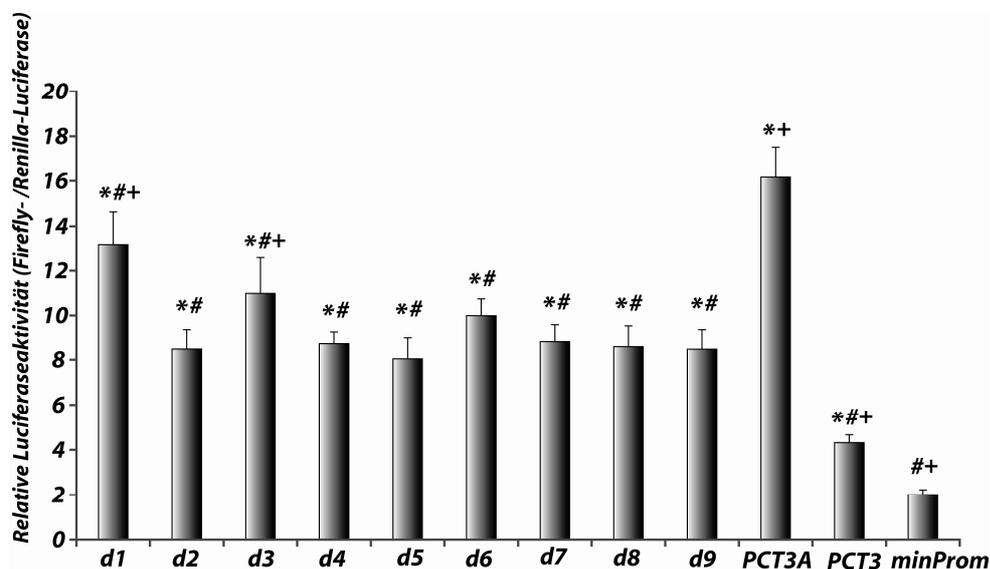


Abbildung 12: Relative Luciferaseaktivität (Firefly- /Renilla-Luciferase) 24 Stunden nach Transfektion von HEK293-Zellen mit den PCT3Adx - Deletionskonstrukten und einem konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferaseplasmid. Als Kontrollen dienten die unveränderten PCT3A– und PCT3–Konstrukte sowie der Renin–Promotor. Mittelwerte +/- Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede zum minProm–Konstrukt sind mit „*“, statistisch signifikante Unterschiede zum PCT3A–Konstrukt mit „#“ und statistisch signifikante Unterschiede zur Gesamtmenge aller Messwerte mit „+“ gekennzeichnet (p jeweils < 0,05; n=8).

Stimulation der PCT3A-Deletionskonstrukte mit TNF α

Im PCT3A-Fragment sollten Teilbereiche identifiziert werden, die den Effekt von TNF α auf das Element vermitteln. Dazu wurden die Deletionskonstrukte PCT3Ad1 bis PCT3Ad9 erneut in HEK293 Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurde die Hälfte der Wells mit einem TNF α -haltigen Medium behandelt, die übrigen Wells erhielten eine TNF α -freie Kontrolllösung. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen.

Dabei zeigte sich für die Konstrukte mit Deletion der näher am Promotor gelegenen Abschnitte d7, d8 und d9 ein 0,75-facher (PCT3Ad8) bis 0,62-facher (PCT3Ad9) hemmender Einfluss einer Behandlung mit TNF α , der für die Konstrukte mit Deletion der Abschnitte d1 bis d6 aufgehoben oder in einen stimulierenden Effekt umgekehrt war. Ein hemmender Einfluss einer Behandlung mit TNF α war auch in Zellen nachweisbar, die mit dem vollständigen PCT3-Reporterkonstrukt transfiziert worden waren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

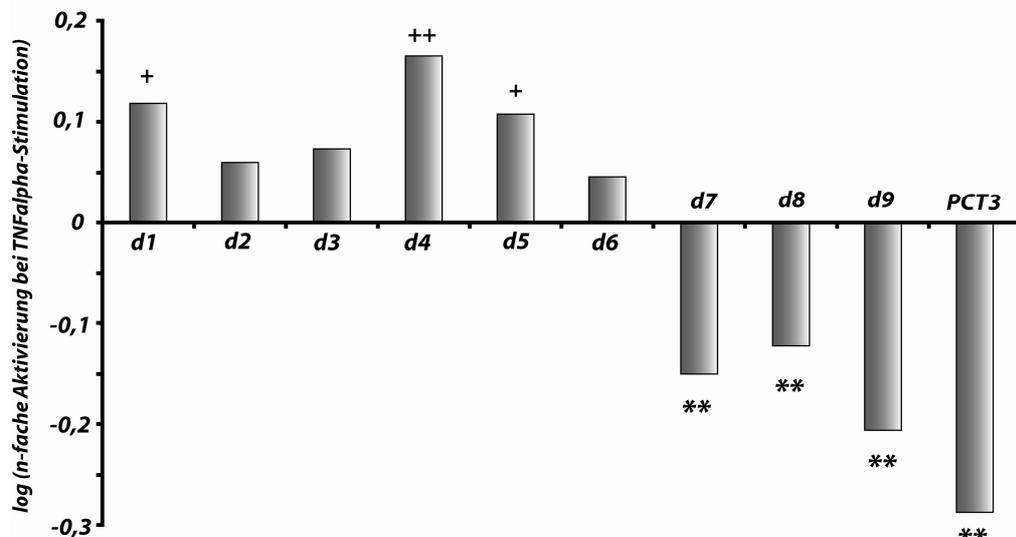


Abbildung 13: Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität der Konstrukte PCT3Ad1-d9 und PCT3 unter einer Behandlung mit TNF α (10 μ g/l), 48 Stunden nach Transfektion und 24 Stunden nach Behandlung der Zellen mit TNF α -haltiger Lösung oder Kontrollmedium. Dargestellt ist für jedes Reporterkonstrukt der Zehnerlogarithmus der Quotienten (Mittelwert relative Luciferaseaktivität unter TNF α -Behandlung) / (Mittelwert relative Luciferaseaktivität ohne TNF α -Stimulation). Signifikante Abschwächungen der relativen Luciferaseaktivität unter TNF α sind mit ** ($p < 0,01$), signifikante Steigerungen der relativen Luciferaseaktivität sind mit + ($p < 0,05$) oder ++ ($p < 0,01$) gekennzeichnet; $n = 7$ (jeweils für Versuche mit TNF α -Behandlung und Kontrollen ohne TNF α -Behandlung).

3.2 Einfluss des nukleären Rezeptors HNF4 auf nicht-codierende DNA-Elemente stromaufwärts des Renin-Gens

3.2.1 Identifikation potentieller HNF4-Bindungsstellen stromaufwärts des Renin – Gens

Es wurde eine Transkriptionsfaktor – Bindungsstellenanalyse mit *MatInspector* unter Standardeinstellungen durchgeführt.

Dabei ergaben sich zwei potentielle HNF4-Bindungsstellen innerhalb der PCT3–Region (-13102bp bis -13082bp und -13035bp bis -13015bp), die beide im Teilstück PCT3B lokalisiert waren, sowie fünf HNF4–Bindungsstellen innerhalb von -5797bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes (einschließlich Promotor und Chorion-Enhancer). Der minimale Renin-Promotor (minProm) enthielt keine HNF4–Bindungsstelle, jedoch ein einer HNF4 –Bindungsstelle ähnliches potentielles PPAR–Bindungsmotiv (im Folgenden bezeichnet als "HRE-like", entsprechend ⁵⁴).

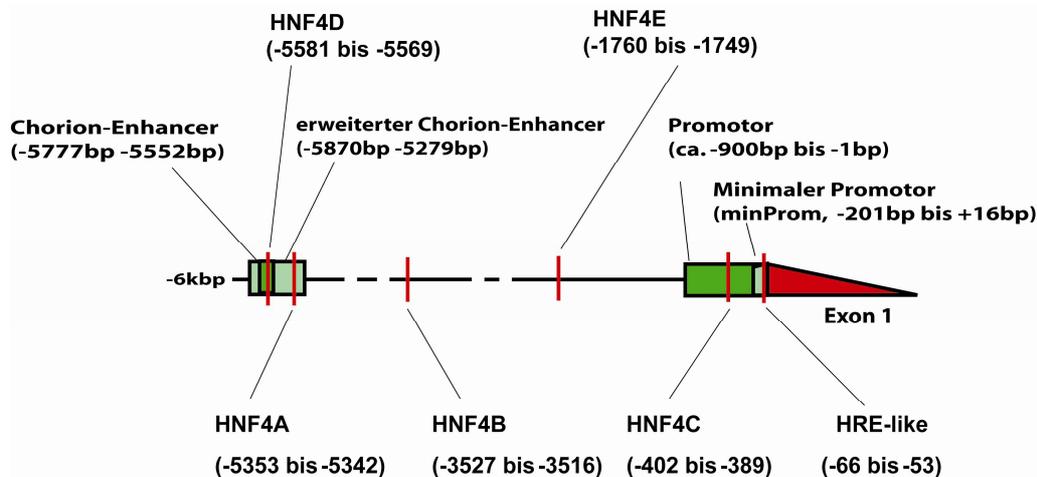


Abbildung 14: Potentielle HNF4 – Bindungsstellen innerhalb ca. 6000bp stromaufwärts des ReninGens im genomischen Kontext. Alle Positionsangaben beziehen sich auf Entfernungen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des Renin-Gens. Die Pfeilspitze weist in Transkriptionsrichtung.

3.2.2 Luciferase – Reporterassays

Einfluss einer HNF4-Überexpression auf nicht-codierende DNA-Elemente stromaufwärts des Renin-Gens

Um einen potentiellen Einfluss des Transkriptionsfaktors HNF4 auf nicht-codierende DNA-Elemente stromaufwärts des Renin-Gens experimentell zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen gleichzeitig mit einem HNF4-Expressionsvektor (pCMV-HNF4S) und einem Reporterkonstrukt, das die jeweilige stromaufwärts des Renin-Gens gelegene Sequenz und ein Firefly-Luciferase-Gen enthielt, cotransfiziert. Im Einzelnen wurden der minimale Renin-Promotor, der Renin-Promotor mit vorgeschalteter PCT3B-Sequenz und ein Konstrukt, das die -5797bp stromaufwärts des Renin-Gens enthielt (einschließlich Promotor und Chorion-Enhancer), auf eine Aktivierbarkeit durch eine HNF4-Überexpression getestet (Abbildung 15). Als Kontrolle dienten HEK293-Zellen, die anstelle des HNF4-Expressionsvektors mit einem pcDNA3-Plasmid, das das Grundgerüst für den HNF4-Expressionsvektor bildet, transfiziert wurden (Leervektor-kontrolle). Die Luciferase-Aktivität wurde nach 24 Stunden gemessen und als Quotient Firefly-Luciferase / Renilla-Luciferase angegeben.

Es zeigten sich ein 1,7-facher aktivierender Einfluss einer HNF4-Überexpression auf den Renin-Promotor, der bei vorgeschaltetem PCT3B-Element auf einen 3,7-fachen aktivierenden Einfluss gesteigert war. Für das -5797bp-Element ergab sich eine ca. 6-fache Aktivierung bei HNF4-Überexpression (Abbildung 16).

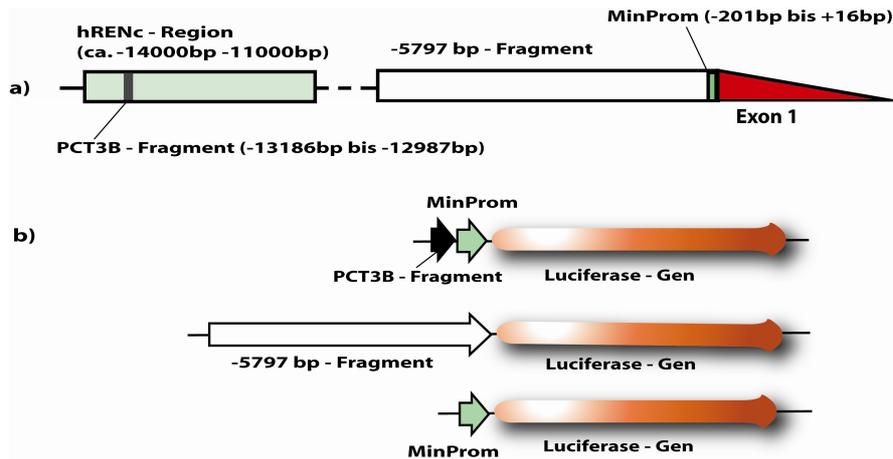


Abbildung 15: Lage der DNA-Elemente im genomischen Kontext stromaufwärts des Renin-Gens (a) und schematische Darstellung der Reporterkonstrukte (b). Alle Positionsangaben beziehen sich auf Entfernungen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des Renin-Gens, die Pfeilspitzen weisen in Transkriptionsrichtung.

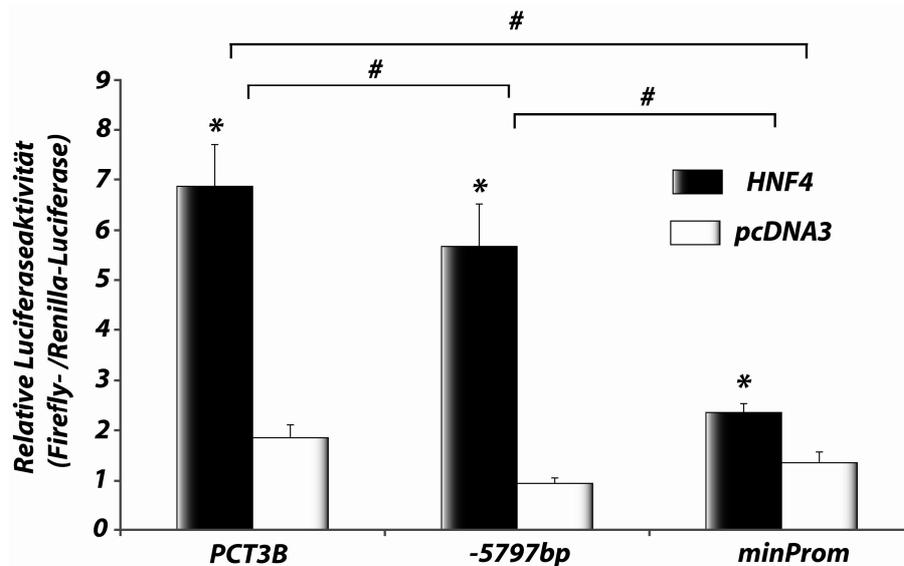


Abbildung 16: Relative Luciferaseaktivität (Firefly-/Renilla-Luciferase) 24 Stunden nach Transfektion von HEK293-Zellen mit den PCT3B-, -5797bp- und minProm-Konstrukten und einem konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferaseplasmid. Die schwarzen Balken zeigen die Luciferaseaktivität bei Co-Transfektion mit einem HNF4-Expressionsvektor (pCMV – HNF4S), die weißen Balken bei Co-Transfektion mit einem leeren pcDNA3-Plasmid ohne HNF4-Gen als Kontrollen (Mittelwerte +/- Standardabweichung). Statistisch signifikante Unterschiede der Aktivitäten bei Transfektion mit pCMV-HNF4S zu den jeweiligen Kontrollen sind mit * gekennzeichnet, Unterschiede zwischen den Konstrukten bezüglich ihrer Aktivierbarkeit durch die HNF4-Überexpression sind mit # gekennzeichnet (Irrtumswahrscheinlichkeit p jeweils < 0,01; n=8).

Deletion einer potentiellen HNF4 – Bindungsstelle im PCT3B - Konstrukt

Um zu testen, ob der aktivierende Effekt von HNF4 auf das PCT3B–Element über eine der vorhergesagten Bindungsstellen vermittelt wird, wurde ein Plasmid generiert, das mit dem PCT3B–Plasmid identisch war, jedoch eine Deletion von 21bp (-13102bp bis -13082bp stromaufwärts des Renin-Gens) im Umfeld der HNF4-Bindungsstelle enthielt (PCT3Bd1, Abbildung 17). Die Aktivierbarkeit des Plasmides bei HNF4–Überexpression wurde im Luciferase–Assay gegen das PCT3B–Plasmid ohne HNF4–Bindungsstellendeletion getestet.

Es ergab sich eine 2,3-fache Aktivierung des PCT3Bd1–Konstruktes gegenüber einer 3,3-fachen Aktivierung des unveränderten PCT3B–Konstruktes bei HNF4–Überexpression (Abbildung 18).

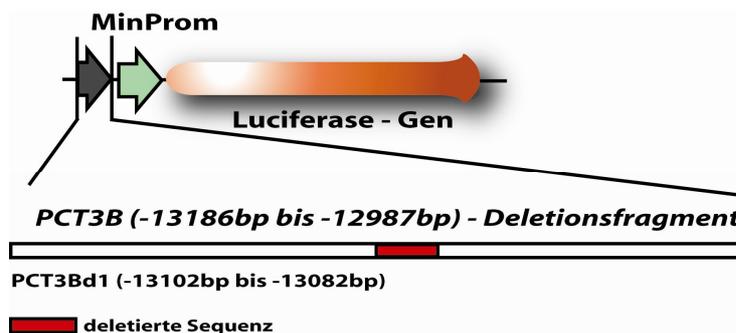


Abbildung 17: Deletion einer potentiellen HNF4-Bindungsstelle im PCT3B-Fragment (PCT3Bd1-Konstrukt). Alle Positionsangaben beziehen sich auf Entfernungen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des Renin-Gens im genomischen Kontext.

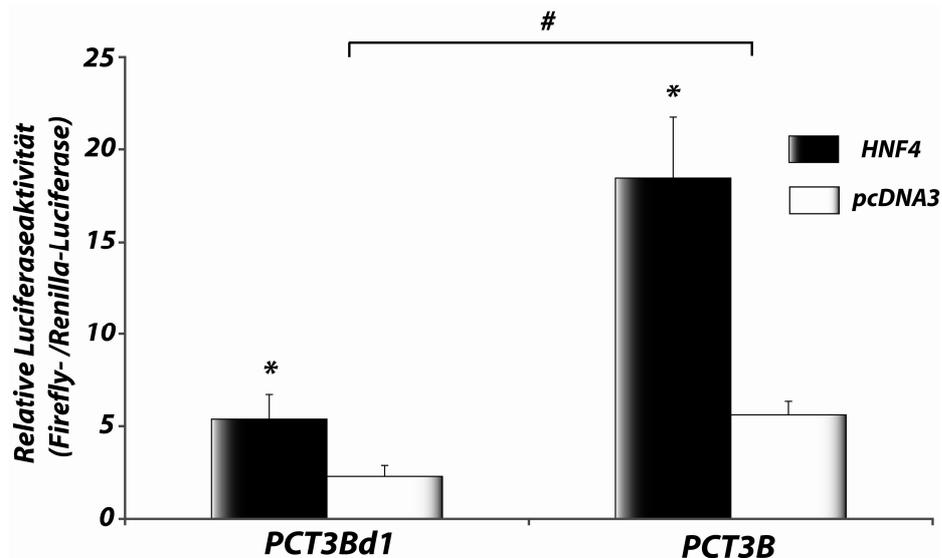


Abbildung 18: Relative Luciferaseaktivität (Firefly-/Renilla-Luciferase) 24 Stunden nach Transfektion von HEK293-Zellen mit den PCT3B- und PCT3Bd1-Konstrukten sowie einem konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferaseplasmid. Die schwarzen Balken zeigen die Luciferaseaktivität bei Co-Transfektion mit einem HNF4-Expressionsvektor (pCMV-HNF4S), die weißen Balken bei Co-Transfektion mit einem leeren pcDNA3-Plasmid ohne HNF4-Gen als Kontrollen (Mittelwerte +/- Standardabweichung). Statistisch signifikante Unterschiede der Aktivitäten bei Transfektion mit pCMV-HNF4S zu der jeweiligen pcDNA3-Kontrolle sind mit * gekennzeichnet, ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Konstrukten bezüglich ihrer Aktivierbarkeit durch die HNF4-Überexpression ist mit # gekennzeichnet (Irrtumswahrscheinlichkeit p jeweils < 0,05; n=10).

Mutation von drei potentiellen HNF4-Bindungsstellen innerhalb -5797bp stromaufwärts des Renin-Gens

Zur Lokalisation funktionell relevanter HNF4-Bindungsstellen innerhalb des -5797bp-Konstruktes wurden drei Reporterplasmide (HNF4A, HNF4B und HNF4C + HRE-like) generiert, die mutierte Sequenzen der vorhergesagten HNF4-Bindungsstellen enthielten, sonst jedoch mit dem -5797bp-Konstrukt identisch waren. Die Mutationen sind in Abbildung 19 dargestellt. In einer Serie von Luciferase-Reporterassays wurden die Plasmide in HEK293-Zellen transfiziert und die relative Luciferase-Aktivität (Firefly-/Renilla-Luciferase) unter HNF4-Überexpression und unter Transfektion mit dem leeren pcDNA3-Kontrollplasmid nach 24 Stunden gemessen. Als Kontrolle dienten das unveränderte -5797bp-Plasmid sowie die Mutation einer theoretisch vorhergesagten, einem HNF4-Bindungselement ähnlichen PPAR-Bindungsstelle innerhalb des Renin-Promotors („HRE-like“).

Während die Aktivierbarkeit des -5797bp-Fragmentes durch eine HNF4-Überexpression bestätigt werden konnte, ließ sich keine Abschwächung des Effektes in den Mutationskonstrukten nachweisen (Abbildung 20).

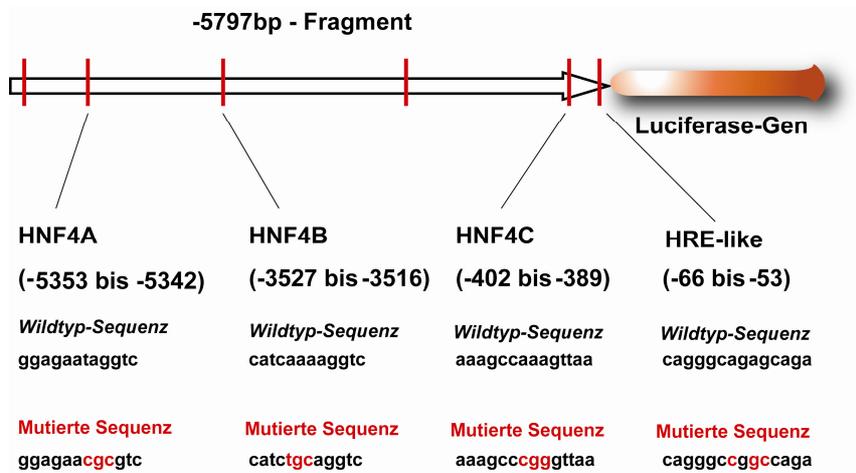


Abbildung 19: Karte der eingefügten Mutationen innerhalb des -5797bp-Konstruktes. Alle Positionsangaben beziehen sich auf Entfernungen stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des ReninGens.

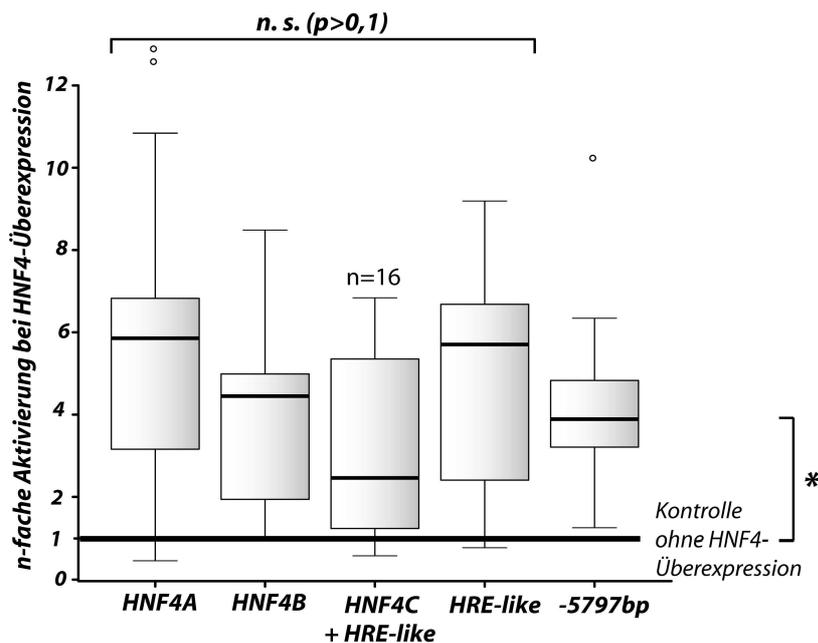


Abbildung 20: Aktivierung des -5797bp-Konstruktes und der HNF4-Bindungsstellen-Deletionskonstrukte bei Überexpression von HNF4 (relative Luciferaseaktivität in HNF4-stimulierten Zellen/relative Luciferaseaktivität in mit pcDNA3-Kontrollvektor behandelten Zellen). Median +/- Quartile (Box) und 5, 95 - Perzentile (Whiskers). Die Aktivierbarkeit des -5797bp-Konstruktes durch eine HNF4-Überexpression wurde mit $p < 0,001$ (*) bestätigt. Eine statistisch signifikante Abschwächung dieses Effektes ($p < 0,05$) in einem der Mutationskonstrukte ließ sich nicht nachweisen; $n = 32$ (jeweils für Versuche mit HNF4-Überexpression und Kontrollen ohne HNF4-Überexpression), soweit nicht anders angegeben.

3.3 Einfluss von Eicosapentaensäure auf den Renin-mRNA-Gehalt in nativen kultivierten JG-Zellen

JG-Zellen wurden aus murinen Nieren isoliert und kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte eine Behandlung der Zellen mit einer Eicosapentaensäure (EPA) - Albuminlösung in einer Konzentration von 25µM, 50µM und 100µM EPA. Als Kontrollen dienten JG-Zellen, die mit einer fettsäurefreien Albuminlösung ohne Fettsäurezusatz behandelt worden waren. Um die Integrität der Zellen zu testen, wurden als Positivkontrolle sowohl mit EPA als auch mit fettsäurefreier Albuminlösung behandelte Zellen zusätzlich mit Forskolin in einer Konzentration von 10µmol/l stimuliert. Die Zellen wurden nach weiteren 24 Stunden geerntet, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die enthaltene Menge cDNA wurde für Renin und β -Actin als Housekeeping-Gen mittels Real-Time-PCR relativ zu einer Standardprobe quantifiziert und als Quotient Renin-mRNA/ β -Actin-mRNA angegeben.

In den mit der fettsäurefreien Kontrolllösung behandelten Proben zeigte sich erwartungsgemäß ein Anstieg der Renin-mRNA-Menge um einen Faktor von 5-8 unter Stimulation mit Forskolin, was auf einen integren Zustand der Zellen schließen ließ. Unter einer Behandlung mit EPA war die Renin-mRNA-Menge in den Zellen auf ein 0,42faches (25µM EPA) bis auf ein 0,24faches (100µM EPA) gegenüber den Kontrollen reduziert. Ein inhibitorischer Effekt von EPA auf den Renin-mRNA-Gehalt der JG-Zellen war auch unter Stimulation mit Forskolin nachweisbar; hier konnte für eine EPA-Konzentration von 100µM eine Reduktion der Renin-mRNA auf ein 0,48faches gegenüber den fettsäurefreien Vergleichsproben gemessen werden. Ein Einfluss der EPA auf die Stimulierbarkeit der Zellen durch Forskolin konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

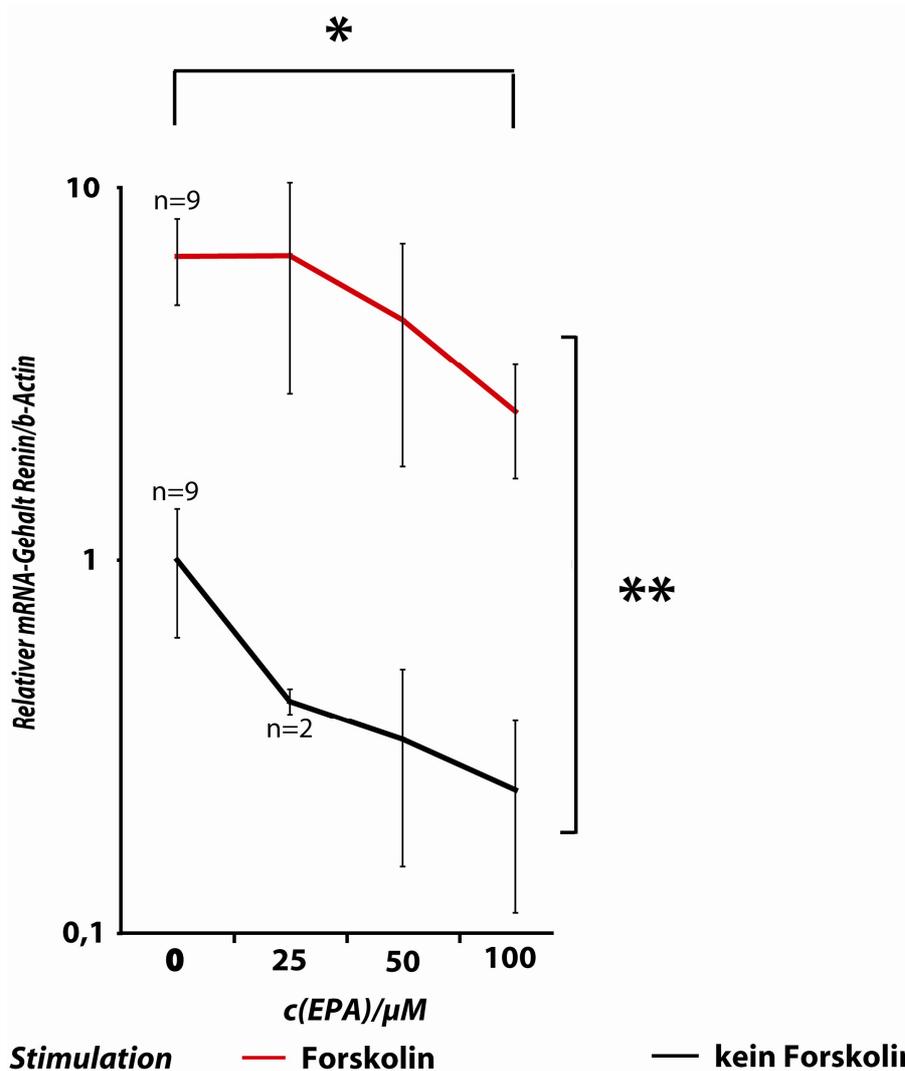


Abbildung 21: Relativer Renin-mRNA-Gehalt (Renin-mRNA/ β -Actin-mRNA) in isolierten kultivierten JG-Zellen. Die Zellen wurden mit Eicosapentaensäure (EPA) – Albuminlösung in Konzentrationen von 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M oder mit fettsäurefreier Albuminlösung (0 μ M EPA) behandelt und für 24h inkubiert, bevor die Messung mittels Real-Time-PCR erfolgte. Jeweils die Hälfte der Zellen jeder EPA-Konzentrationsstufe wurde zusätzlich mit Forskolin in einer Konzentration von 10 μ mol/l behandelt. Ein statistisch signifikanter Einfluss der Behandlung mit EPA wurde mit *, ein Einfluss der Stimulation mit Forskolin mit ** gekennzeichnet (p jeweils <0,02). Ein Einfluss der Behandlung mit EPA auf die Stimulierbarkeit der Zellen durch Forskolin konnte nicht nachgewiesen werden (p>0,1 für Interaktion). Alle Werte sind angegeben als Mittelwert +/- Standardabweichung relativ zu den nicht stimulierten Ansätzen (c(EPA)=0 μ M, kein Forskolin); n=3, soweit nicht anders angegeben.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung der PCT3–Region für die Regulation der Renin-Transkription

Nachdem für den renalen Renin-Enhancer in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* durchgeführten Experimenten deutliche Hinweise auf eine Rolle in der Transkriptions-Regulation des humanen Renin-Gens gewonnen werden konnten, sind auch andere Bereiche der evolutionär konservierten hREnc-Region verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Dabei konnte sowohl für eine potentielle WT1-Bindungsstelle bei ca. -11,1kbp als auch für eine bei ca. -14kbp gelegene Region (*CNSmd*) eine gute Übereinstimmung der *in silico* und experimentell gewonnenen Daten festgestellt werden. Beide evolutionär konservierten Elemente zeigten auch einen deutlichen Einfluss auf die Renin-Promotoraktivität im Luciferase-Reporterassay^{36,67}, und die Transkriptionsfaktor-Bindung an das WT1-Element konnte in Gelshift-Experimenten bestätigt werden³⁶. Diese Befunde – wie auch die hohe evolutionäre Konserviertheit des renalen Enhancers^{48,57} – legen nahe, dass die verbreitete Methode des Inter-spezies-Vergleiches nicht-codierender DNA-Elemente auch zur Identifikation regulatorischer cis-Elemente stromaufwärts des Renin-Gens ein vielversprechendes Werkzeug darstellen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Luciferase-Reporterassays ein aktivierender Einfluss einer bei -13337bp bis -12618bp stromaufwärts des humanen Renin-Gens gelegenen, ca. 720bp umfassenden Region (PCT3) und ihrer je ca. 200bp umfassenden Teilbereiche PCT3A-D auf die Aktivität des minimalen Renin-Promotors festgestellt. Als Modell dienten dabei HEK293-Zellen, die bereits als ein geeignetes Werkzeug für Untersuchungen zur Renin-Transkription beschrieben worden sind³⁶.

Den stärksten Effekt zeigte die am weitesten distal gelegene PCT3-Teilsequenz (PCT3A), während die anderen Teilsequenzen schwächere Aktivierungen des Renin-Promotors in der Folge PCT3A>PCT3>PCT3B>PCT3D bewirkten. Die PCT3C-Teilsequenz hatte keinen Einfluss auf die Renin-Promotoraktivität.

Dieses Ergebnis korreliert insofern gut mit der evolutionären Konserviertheit der Teilelemente, als die PCT3A-Region fast deckungsgleich ist mit einer zwischen Mensch und Maus evolutionär konservierten Region (*ECR Maus*) und zudem vollständig inner-

halb einer evolutionär konservierten Region zwischen Mensch und Hund (*ECR Hund*) liegt. Letztere ECR umfasst zudem 142bp des PCT3B-Elementes, während die Teilbereiche PCT3C und PCT3D keine evolutionär ähnlich hochkonservierten Regionen enthalten. Dass der Effekt des vollständigen PCT3-Elementes auf den Renin-Promotor geringer ausgeprägt ist als der des isolierten PCT3A-Teilabschnittes, spricht für das Vorliegen eines komplexen regulatorischen Elementes, in dem der aktivierende Effekt von PCT3A durch das gleichzeitige Vorhandensein eines oder mehrerer der anderen Teilelemente abgeschwächt wird, obwohl diese isoliert betrachtet keine inhibitorische Wirkung zeigen. Um die genaue Funktionsweise des Elementes aufzuklären, kämen Reporterassays mit multiplen Kombinationen der PCT3-Teilelemente in Betracht, wie in der Literatur für die *CNSmd-Region* beschrieben⁶⁷.

Um den Einfluss der PCT3-Teilregionen auf den Renin-Promotor näher zu charakterisieren und Hinweise auf mögliche an dem Effekt beteiligte Transkriptionsfaktoren zu gewinnen, wurde auch die Modulierbarkeit der Effekte unter verschiedenen, in der Regulation der Renin-Transkription beschriebenen, Stimulationsbedingungen getestet.

Auf den minimalen Renin-Promotor ohne vorgeschaltete PCT3-Teilsequenz zeigten von den getesteten Stimulationsbedingungen Angiotensin II und TNF α einen aktivierenden Effekt, während die Promotoraktivität durch Phorbol ester gehemmt wurde. Dabei ist eine inhibitorische Wirkung des von Phorbol estern aktivierten PKC-Signalweges auf die Renin-Transkription bereits beschrieben worden¹⁰⁰. Im Gegensatz dazu scheint die stimulierende Wirkung von Angiotensin II und TNF α auf das minProm-Konstrukt im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen inhibitorischen Effekten dieser Substanzen auf die Renin-Transkription^{61,100,101} zu stehen. Ein ähnlicher paradoxer aktivierender Effekt von Angiotensin II auf den humanen Renin-Promotor wurde allerdings im Zusammenhang mit *in vivo* durchgeführten Experimenten (humanes Reporterkonstrukt mit ca. -900bp stromaufwärts des Renin-Gens in einem transgenen murinen Modell) bekannt. Dieser Effekt wurde von den Autoren u.a. dadurch erklärt, dass einige der für den insgesamt hemmenden Angiotensin II-Einfluss verantwortlichen DNA-Elemente möglicherweise weiter stromaufwärts liegen, wenn man von einer teilweisen Vermittlung des Angiotensin II-Effektes über andere als den PKC-Weg, etwa über einen cGMP-Mechanismus, ausgeht¹⁰². Ähnliches könnte der stimulierenden TNF α -Wirkung auf den Renin-Promotor in der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen. Jedenfalls sind die für den insgesamt inhibitorischen Effekt des Zytokins auf die Renin-Transkription verantwortli-

chen DNA-Elemente sowohl für das murine als auch für das humane Renin-Gen weiter stromaufwärts identifiziert worden (bei der Maus Bindung von NFκB an ein CRE bei ca. -2,7kbp, beim Menschen Vermittlung des TNFα-Effektes über den Abschnitt zwischen -3916bp und -2822bp)^{62,103,104}.

Für Forskolin konnte kein Effekt auf den minimalen Renin-Promotor gezeigt werden, allerdings liegen auch hier für den insgesamt aktivierenden Effekt der Substanz auf die Renin-Transkription verantwortliche CRE-Bindungsstellen weiter stromaufwärts bei -218 bp bis -226bp im Promotor^{105,106} sowie im renalen Enhancer⁴⁹.

Die Wechselwirkung der PCT3-Teilfragmente mit dem minimalen Renin-Promotor konnte in den Stimulationsexperimenten insbesondere durch TNFα beeinflusst werden. Unter dieser Stimulationsbedingung wurde der aktivierende Einfluss aller PCT3-Teilfragmente aufgehoben oder in einen inhibitorischen Einfluss umgewandelt, so dass ein hemmender Effekt von TNFα auf das humane Renin-Gen auch über die PCT3-Region vermittelt werden könnte. Zur experimentellen Überprüfung dieser These wären allerdings noch weitere Experimente erforderlich, etwa Mutationsanalysen und Gelshift-Assays mit für die Vermittlung eines solchen Effektes infrage kommenden Bindungsmotiven (z.B. NFκB- und CRE-Elemente). Da Forskolin keinen Effekt auf die PCT3-Teilelemente zeigte, erscheint eine Beteiligung der Region an der cAMP-vermittelten Aktivierung der Renin-Transkription als unwahrscheinlich.

Zur näheren Charakterisierung des dominanten Einflusses des PCT3A-Teilstückes wurde eine Feinkartierung des Elementes durch die Erzeugung von neun Deletionskonstrukten mit Verlust von je ca. 20bp vorgenommen und durch eine *in silico*-Transkriptionsfaktor-Bindungsstellenanalyse ergänzt.

Dabei waren mit Ausnahme einer WT1-Bindungsstelle ausschließlich Bindungselemente für Transkriptionsfaktoren vertreten, die einen positiven Einfluss auf die Renin-Transkription haben (CREB¹⁰⁷, SP1^{52,65}, PPARγ^{54,55} und RAR/RXR⁶³), was gut mit dem experimentell aktivierenden Effekt des Elementes korreliert. Von den 9 getesteten Deletionskonstrukten zeigten alle gegenüber dem unveränderten PCT3A-Vektor eine signifikante Abschwächung des stimulierenden Effektes auf den Renin-Promotor, was für eine funktionelle Bedeutung des gesamten Elementes spricht. Allerdings war diese Abschwächung des PCT3A-Effektes für die Deletionen 1 und 3 am geringsten ausgeprägt, was gut mit der in diesen Bereichen geringen Dichte von Transkriptionsfaktor-

Bindungsstellen, bezogen auf bereits bekannte Regulatoren der Renin-Transkription, übereinstimmt. Der inhibitorische Einfluss von TNF α auf das PCT3A-Element war für die Deletionen d1-d6 aufgehoben, während er bei Deletion der Bereiche d7, d8 und d9 Bestand hatte. Möglicherweise könnte hier eine Vermittlung des inhibitorischen Effektes von TNF α über die in den Bereichen d1 bis d5 gelegenen CREB-Elemente eine Rolle spielen. Um den Einfluss der einzelnen Transkriptionsfaktoren auf die PCT3A-Region näher zu untersuchen, wären jedoch in weiteren Versuchen Mutationsanalysen, Gelshift- und Chromatin-Immunopräzipitations-(CHIP)-Untersuchungen sinnvoll.

Insgesamt unterstreichen die Ergebnisse zur PCT3-Region die Bedeutung von Inter-spezies-Vergleichen in der Identifikation neuer regulatorischer Elemente am Beispiel des Renin-Gens. Um eine Rolle der Region als auch *in vivo* bedeutsames regulatorisches Element annehmen zu können, wären jedoch noch einige zusätzliche Untersuchungen erforderlich. Analog zu den Ansätzen, die den Einfluss des renalen und des Chorion-Enhancers näher ausgeleuchtet haben ^{39,40,66}, könnten hier ein Knock-out der entsprechenden konservierten Sequenzen oder das Einbringen eines humanen Reporterkonstruktes in einem transgenen murinen Modell wegweisend sein.

4.2 Der Einfluss des nukleären Rezeptors HNF4 auf die Expression des Renin-Gens

Seitdem ein stimulierender Einfluss der Transkriptionsfaktoren RAR/RXR⁶³, LXR α/β ^{32,53} und zuletzt PPAR γ ^{54,55} auf die Expression des Renin-Gens nachgewiesen werden konnte, hat die Beeinflussung der Renin-Transkription durch nukleäre Rezeptorproteine zunehmende Aufmerksamkeit gefunden. Ein Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren ist dabei insofern von besonderem Interesse, als zahlreiche hormonelle und metabolische Wirkungen auf die Genexpression durch nukleäre Rezeptoren vermittelt werden und diese damit im Netzwerk der Regulation von Lipidstoffwechsel, Glucosestoffwechsel und Blutdruck eine Schlüsselposition im Verständnis epidemiologisch bedeutsamer pathophysiologischer Zustände wie der Adipositas und des metabolischen Syndroms einnehmen. Spätestens seit Einführung von PPAR γ -Agonisten (*Glitazone*) als orale Antidiabetika ist dies auch aus klinisch-praktischer Sicht evident. Unter den Mitgliedern der nukleären Rezeptorfamilie ist ein Einfluss von HNF4 auf die Renin-Transkription bisher nicht beschrieben worden.

Ausgangspunkt der für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Regulation der Renin-Expression durch HNF4 bildete die Identifikation potentieller Transkriptionsfaktorbindungsstellen für den Faktor stromaufwärts des humanen Renin-Gens durch eine *in silico*-Analyse. Dabei waren die identifizierten Bindungsstellen überwiegend in bereits bekannten regulatorischen Elementen des Renin-Gens lokalisiert (*HNF4D* und *HNF4A* im Chorion-Enhancer bzw. erweiterten Chorion-Enhancer, *HNF4C* im (nicht-minimalen) Renin-Promotor) oder in evolutionär konservierten Elementen (zwei HNF4-Bindungsstellen im PCT3B-Element). Eine experimentelle Überprüfung des Einflusses von HNF4 auf stromaufwärts des Renin-Gens gelegene nicht-codierende DNA-Abschnitte im Luciferase-Reporterassay ergab eine mehr als dreifache Aktivierung des minimalen Renin-Promotors bei vorgeschaltetem PCT3B-Element und eine ca. 6-fache Aktivierung der -5797bp stromaufwärts des Renin-Gens bei HNF4-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle. Überraschenderweise wurde auch der minimale Renin-Promotor durch eine HNF4-Überexpression 1,7-fach aktiviert, obwohl in diesem Bereich keine HNF4-Bindungsstelle gefunden wurde. Hier käme etwa die Bindung von HNF4 an ein potentielles PPAR-Bindungselement („HRE-like“, nach⁵⁴) in Betracht. So konnte bereits für einige Gene, etwa das Angiotensinogen-Gen⁹³, das Acyl-CoA-Oxidase-

Gen¹⁰⁸ und das PEPCK-Gen⁷³ eine Kompetition verschiedener nukleärer Rezeptoren wie HNF4, PPAR α , RXR und COUP-TF um identische Bindungselemente nachgewiesen werden.

Um die Bedeutung der potentiellen HNF4-Bindungsstellen experimentell zu untersuchen, wurden für diese Arbeit Reporterkonstrukte mit der Deletion einer HNF4-Bindungsstelle im PCT3B-Fragment (HNF4d1, lokalisiert in der evolutionär konservierten *ECR Hund*) und mit Mutationen von drei potentiellen HNF4-Bindungsstellen innerhalb des -5797bp-Konstruktes hergestellt (HNF4A innerhalb des erweiterten Chorion-Enhancers, HNF4B, HNF4C innerhalb des (nicht-minimalen) Renin-Promotors). Dabei konnte für die Deletion der Bindungsstelle im PCT3B-Fragment eine Abschwächung der Aktivierbarkeit des Konstruktes durch HNF4 beobachtet werden, was für eine Bedeutung der Bindungsstelle in der Vermittlung des HNF4-Effektes auf diese Region spricht. Da der Effekt von HNF4 nicht vollständig aufgehoben werden konnte, ist die Vermittlung des Resteffektes über die zweite HNF4-Bindungsstelle im PCT3B-Element möglich. Weitere experimentelle Evidenz für die Bedeutung des HNF4d1-Bindungselementes durch Reporterassays nach Mutation nur einiger Basenpaare, Gelshift- und CHIP-Assays wäre erforderlich.

Für die Mutationen der HNF4-Bindungsstellen innerhalb des -5797bp-Fragmentes konnte kein Einfluss auf die Aktivierbarkeit des Konstruktes durch HNF4 nachgewiesen werden. Hier könnten Gelshift-Assays zeigen, ob HNF4 an die unmutierten Sequenzen bindet und in diesem Fall die DNA-Bindung von HNF4 durch die Mutationen tatsächlich, wie theoretisch vorausgesagt, abgeschwächt oder aufgehoben wird. Sollte sich bestätigen, dass die Bindungsstellen HNF4A, HNF4B und HNF4C keinen Einfluss auf die Aktivierung des Konstruktes durch HNF4 haben, ist eine Vermittlung des Effektes über die HNF4D-Bindungsstelle im Chorion-Enhancer, die HNF4E-Bindungsstelle oder aber über *in silico* nicht als HNF4-Bindungsstellen identifizierte Bindungselemente für andere nukleäre Rezeptoren mit Ähnlichkeit zur AGGTCAN(N)AGGTCA - Konsensussequenz wahrscheinlich.

Ausgehend von dem Effekt einer HNF4-Überexpression auf die getesteten Reporterkonstrukte ist auch die Modulierbarkeit dieses Einflusses durch Liganden bzw. Co-faktoren des Transkriptionsfaktors wie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren von Interesse. Während ursprünglich eine Stimulation der DNA-Bindung und transkriptionellen Aktivität von HNF4 durch CoenzymA-Thioester von gesättigten Fettsäuren mit Ausnah-

me der Stearinsäure und eine Hemmung durch ungesättigte Fettsäuren gefunden wurde⁹⁴, haben Untersuchungen am Glucose-6-Phosphatase-Gen gezeigt, dass diese Effekte für dieses Zielgen nur zum Teil reproduzierbar waren⁹⁵. Sie sollten daher auch in Bezug auf regulatorische Elemente des Renin-Gens experimentell durch Luciferase-Assays unter Zugabe von Fettsäuren neu verifiziert werden. Dass erste eigene experimentelle Daten (*nicht gezeigt*) mit unterschiedlichen Chargen von HEK293-Zellen hier widersprüchliche Ergebnisse zeigten, nährt die Vermutung einer Abhängigkeit vom verwendeten Zellmodell.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen einen Einfluss von HNF4 auf die Renin-Transkription nahe. Dieser hier im Luciferase-Assay gezeigte Effekt sollte jedoch noch für das native Renin-Gen auf mRNA- und Protein-Ebene bestätigt werden. Calu6-Zellen, in denen wegen ihres im Vergleich mit AS4.1-Zellen eher geringen basalen Renin-Expressionsniveaus schon mehrfach positive regulatorische Einflüsse auf die Renin-Transkription gezeigt werden konnten^{32,54,109}, könnten für HNF4-Überexpressionsversuche ein geeignetes Modell darstellen.

Aus einer Regulation der Renin-Transkription durch HNF4 könnten sich dann neue Erkenntnisse für die bisher noch kaum beleuchtete Rolle von HNF4 in der Niere ergeben. Dabei könnte der Transkriptionsfaktor insbesondere einen Beitrag zur Regulation des proximal tubulären lokalen RAAS leisten, wo sowohl HNF4 in großer Menge⁸¹ als auch Renin exprimiert werden^{110,111}. Insbesondere im Hinblick auf die Beeinflussbarkeit des Faktors durch polyungesättigte Fettsäuren wäre dies ein interessanter Aspekt. Perspektivisch längerfristig könnten HNF4-Knock-down-Versuche, etwa mit IRPTC- und MCT-Zellen, die als stabile proximal tubuläre Zelllinien Renin exprimieren^{112,113}, oder *in vivo*-Experimente mit selektiv proximal tubulären HNF4 α -Knockout-Tieren weiteren Aufschluss über die mögliche Rolle von HNF4 in der Steuerung des lokalen renalen RAAS ergeben. Ein solches *in vivo*-Modell steht gegenwärtig allerdings nicht zur Verfügung, und ein allgemeiner Knock-out für HNF4 hat sich bei der Maus als nicht lebensfähig erwiesen⁸⁵.

Im Rahmen der Regulation des proximal tubulären RAAS wäre dann neben Renin auch Angiotensinogen als ein Zielgen von HNF4 von Interesse, das bereits in der Leber als ein HNF4-abhängiges Gen identifiziert werden konnte⁹³ und ebenfalls im proximalen Tubulus mit HNF4 co-exprimiert wird^{114,115}.

4.3 Regulation der Renin - Expression durch Eicosapentaensäure

Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n3) ist in großer Menge in den Ölen von Tiefseefischen und Meeressäugern enthalten und gehört ebenso wie die Docosahexaensäure (22:6n3) zur Gruppe langkettiger Omega3-Fettsäuren. Obwohl für diese Gruppe polyungesättigter Fettsäuren (PUFA) eine experimentelle und klinische Evidenz für günstige Effekte im Zusammenhang mit physiologischen Regulationsmechanismen und pathophysiologischen Zuständen wie der Regulation des Lipid- und Glucosstoffwechsels^{116,117}, der Entwicklung des Mamma- und kolorektalen Karzinoms¹¹⁸ sowie des kardiovaskulären Risikos¹¹⁹ besteht und auch ein blutdrucksenkender Einfluss einer PUFA-Supplementation in klinischen Studien gezeigt werden konnte¹²⁰, ist bislang wenig über die Regulation der Renin-Expression durch Fettsäuren bekannt.

In der Literatur besteht *in-vitro*-Evidenz lediglich für einen stimulierenden Effekt der ungesättigten Nicht-Omega-3-Fettsäuren Ölsäure (18:1) und Linolsäure (18:2) auf die Renin-Transkription, während die gesättigte Stearinsäure (18:0) nur einen minimalen Effekt zeigte⁽⁵⁴⁾, Konzentration der Fettsäuren jeweils 250µM). Diese Effekte wurden im Zusammenhang mit der Regulation des Renin-Gens durch den nukleären Rezeptor PPAR γ interpretiert, dessen aktivierende Wirkung auf die Renin-Transkription durch seine Agonisten (ungesättigte Fettsäuren) verstärkt wird.

Die für diese Arbeit gewonnenen Daten weisen bei Behandlung kultivierter nativer JG-Zellen mit drei Konzentrationen einer EPA-Albuminlösung (25µM, 50µM und 100µM) auf einen inhibitorischen Einfluss auf den Renin-mRNA-Gehalt der Zellen hin. Dabei lässt sich ein posttranskriptioneller Mechanismus, etwa ein Einfluss auf die mRNA-Stabilität, nicht ausschließen, was experimentell etwa durch ein ähnliches Versuchsprotokoll unter Zugabe eines Transkriptioninhibitors wie Actinomycin D überprüft werden könnte.

Geht man von einem Effekt der EPA auf der Transkriptionsebene aus, so sind bislang eine direkte Beeinflussung der Genexpression durch PUFAs über fettsäureabhängige Transkriptionsfaktoren (HNF4, LXR α/β , PPAR α/γ , SREBP, NF κ B)¹²¹ sowie indirekte Mechanismen über Fettsäure-Metabolite, etwa die Prostaglandine E2 und I2¹²², beschrieben worden.

Ein HNF4-kontrollierter Mechanismus wäre denkbar, da der vor dem Hintergrund dieser Arbeit nahe liegende stimulierende Effekt des Faktors auf die Renin-Transkription durch

EPA abgeschwächt werden dürfte, denn die Fettsäure vermindert die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors⁹⁴. Eine ausreichende experimentelle Evidenz speziell für regulatorische Elemente des Renin-Gens liegt hierzu jedoch noch nicht vor, und es ist fraglich, ob HNF4 in den JG-Zellen exprimiert wird⁸¹. Ein PPAR γ - oder NF κ B-abhängiger Mechanismus für den inhibitorischen Effekt der EPA wären als unwahrscheinlich anzusehen, da man für PPAR γ eine Steigerung eines aktivierenden Einflusses⁵⁴, für NF κ B die Hemmung eines inhibitorischen Einflusses^{62,123} auf die Renin-Transkription erwarten würde, in beiden Fällen also eine Steigerung der Renin-mRNA-Menge durch EPA.

Über eine Beteiligung von LXR oder SREBP an dem inhibitorischen EPA-Effekt auf die Renin-mRNA in der JG-Zellkultur könnte gegenwärtig nur spekuliert werden. Da LXR α bereits als ein positiver Regulator der Renin-Transkription identifiziert wurde^{32,53}, dessen Effekt auf seine Zielgene über verschiedene Mechanismen durch EPA abgeschwächt werden kann¹²¹, käme dieser Transkriptionsfaktor durchaus als ein Vermittler des Effektes von EPA in der JG-Zellkultur in Betracht. Allerdings ist für LXR α ein Einfluss auf die Stimulierbarkeit der Zellen durch cAMP beschrieben worden³², während in dieser Arbeit ein Einfluss von EPA auf die Stimulierbarkeit der Zellen durch Forskolin, das die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht, nicht gezeigt werden konnte. Eine Regulation des Renin-Gens durch SREBP ist bisher nicht bekannt geworden.

Neben einem möglichen LXR α - oder HNF4-abhängigen Mechanismus stellt insbesondere der Prostaglandin-Stoffwechsel ein vielversprechendes Erklärungsmodell für den beobachteten Einfluss von EPA auf die Renin-mRNA dar, da ein Anstieg der Renin-mRNA-Menge in JG-Zellen unter Prostaglandin E2 beschrieben wurde²⁶, die Synthese dieses Prostaglandins aus Arachidonsäure jedoch durch kompetitive Blockade des Enzyms Cyclooxygenase-1 (COX-1) durch EPA gehemmt wird¹²⁴. Eine Wiederholung des Versuchsprotokolls unter pharmakologischer COX-Hemmung, etwa durch Acetylsalicylsäure, könnte hier erste experimentelle Hinweise geben. Gegen eine Beteiligung eines Prostaglandin-Mechanismus an dem EPA-Effekt auf die JG-Zellkultur spricht auch nicht, dass die Cyclooxygenase in der Niere möglicherweise in anderen als den JG-Zellen (etwa im Mesangium,²⁶) lokalisiert ist, da es sich bei der JG-Zellkultur stets um eine zu einem geringen Prozentsatz mit anderen Nierenzelltypen verunreinigte Mischkultur handelt.

Einen Überblick über die diskutierten Mechanismen gibt Abbildung 22.

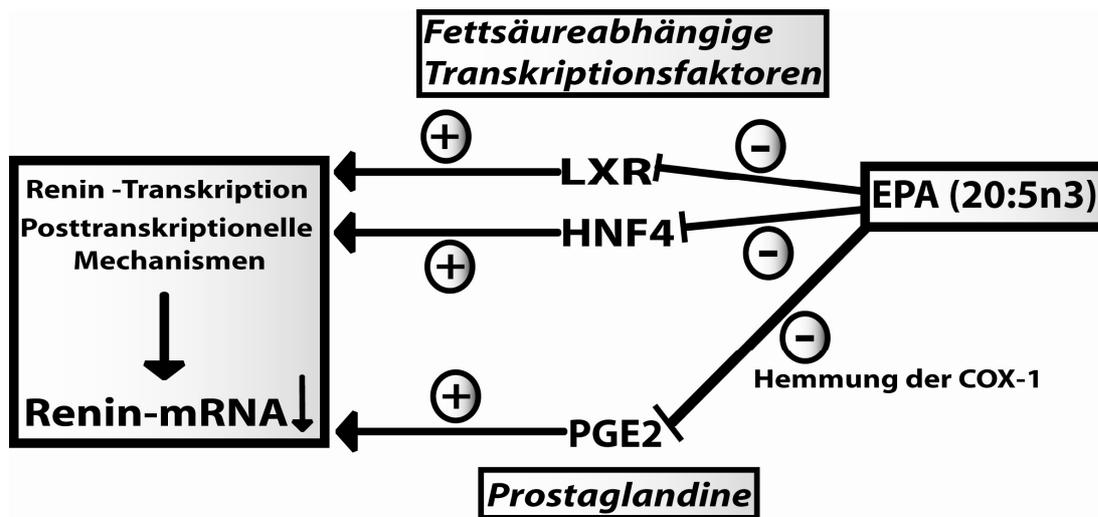


Abbildung 22: Schema potentieller Mechanismen einer inhibitorischen Wirkung von Eicosapentaensäure auf die Renin-mRNA-Menge in JG-Zellen. Insbesondere ein über LXR α und Prostaglandin E2 vermittelter Mechanismus würde ein theoretisch naheliegendes Erklärungsmodell darstellen, während die Expression von HNF4 in JG-Zellen bislang nicht gesichert ist.

Vor einem klinischen Hintergrund ist die Verminderung des Renin-mRNA-Gehaltes in JG-Zellen durch EPA vor allem im Zusammenhang mit dem blutdrucksenkenden Effekt der Omega3-Fettsäuren bei Hypertonie-Patienten von Interesse. In klinischen Studien konnte bisher unter Supplementation mit Omega3-Fettsäuren bei vorhandener Blutdrucksenkung jedoch eine gleichbleibende¹²⁵ oder erhöhte Plasma-Renin-Aktivität¹²⁶ bei den untersuchten Patienten gemessen werden. Um einschätzen zu können, ob die Renin-Transkription dennoch einen Platz im Netzwerk der Blutdruckregulation durch Fischöl-Fettsäuren hat, bedürfte es noch weiterer, auch *in vivo* durchgeführter experimenteller und klinischer Untersuchungen.

5 Zusammenfassung

Das Renin-Angiotensin-System (RAAS) spielt für die Langzeit-Blutdruckregulation und die Steuerung des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes im menschlichen Körper eine herausragende Rolle, der seit Entwicklung der ACE-Hemmer und des Renin-Inhibitors Aliskiren auch von klinisch-therapeutischer Seite Rechnung getragen wird. In diesem Zusammenhang ist besonders auch die Regulation der Renin-Freisetzung und der Renin-Synthese auf Transkriptions- und posttranskriptioneller Ebene von großem Interesse. Auf Transkriptionsebene haben bisherige Forschungsarbeiten dabei insbesondere die Funktion der Promotorregion, eines distalen Enhancers (renalener Enhancer bei ca. -11kbp stromaufwärts des humanen Renin-Gens) und eines proximalen Enhancers (Chorion-Enhancer bei ca. -5,5kbp) beleuchtet. Ein Einfluss auf diese Regionen konnte für zahlreiche trans-Faktoren festgestellt werden, darunter CREB (cAMP-Responsive-Element-Binding-Protein), HOX, LXR α/β , PPAR γ , RXR, VDR (Vit.D-Rezeptor) und WT1 (Wilms-Tumor-Suppressor). Bislang wenig experimentelle Evidenz besteht hingegen für den distalen Teil einer bei -11kbp bis -14kbp gelegenen, evolutionär konservierten Region (hREnc-Region), deren proximaler Teil den renalen Enhancer umfasst.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Rolle eines nicht-codierenden, ca. 720bp umfassenden DNA-Abschnittes innerhalb der hREnc-Region bei ca. -13kbp (PCT3-Region) untersucht werden, dessen distal gelegener Anteil (Teilabschnitte PCT3A bei -13341bp bis -13167bp und PCT3B bei -13186bp bis -12987bp) ein hohes Maß an evolutionärer Konserviertheit aufweist. Dazu wurden Reportervektoren generiert, die stromaufwärts des Luciferase-Gens den minimalen Renin-Promotor und, diesem vorgeschaltet, die PCT3-Region oder je ca. 200bp umfassende Teilfragmente der Region (PCT3A-D) enthielten. Die Vektoren wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Luciferase-Aktivität unter verschiedenen Stimulationsbedingungen gemessen (unbehandeltes Medium, Ethanol, Forskolin, Angiotensin II, Phorbol ester, TNF α). Ohne Stimulation zeigten die PCT3-Fragmente einen 1,3-fachen bis 3,3-fachen aktivierenden Einfluss auf den Renin-Promotor (PCT3A>PCT3>PCT3B>PCT3D, kein Effekt von PCT3C), der sich vor allem durch Zugabe von TNF α (c=10 μ mol/l) modulieren ließ (Aufhebung der aktivierenden Effekte, inhibitorischer Effekt für PCT3B, C und D). Deletionen von je ca. 20bp umfassenden Abschnitten des PCT3A-Elementes ergaben für alle Deletionskonstrukte eine Abschwächung des aktivierenden Effektes gegenüber PCT3A. Die Ergebnisse spre-

chen für das Vorliegen eines komplexen regulatorischen Elementes, in dem ein aktivierender Effekt des gesamten PCT3A-Fragmentes auf den Renin-Promotor durch die Fragmente PCT3B, C und D abgeschwächt wird, die isoliert keinen inhibitorischen Einfluss zeigen. Um die Funktionsweise der PCT3-Region und den Mechanismus der Wirkung von TNF α in diesem Abschnitt näher auszuleuchten, müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden, darunter Reporterassays mit multiplen Kombinationen der PCT3-Teilabschnitte, Gelshift- und CHIP-Assays. Aufschluss über die Funktion des PCT3-Elementes *in vivo* und im Kontext mit dem renalen und dem Chorion-Enhancer könnten aus murinen transgenen oder Knock-out-Modellen gewonnen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des Fettsäure-abhängigen nukleären Rezeptors HNF4 auf regulatorische cis-Elemente des Renin-Gens untersucht, für den potentielle Bindungsstellen im PCT3B-Element und in den -5797bp unmittelbar stromaufwärts des Exon1 identifiziert werden konnten. Hier zeigte sich im Luciferase-Reporterassay eine 3,7-fache Aktivierung des PCT3B-Vektors sowie eine 6-fache Aktivierung eines -5797bp-Reportervektors unter HNF4-Überexpression. Diese Effekte konnten durch die Deletion einer HNF4-Bindungsstelle bei -13102bp bis -13082bp im PCT3B-Element, nicht jedoch durch Mutation von drei potentiellen Bindungsstellen im -5797bp-Element abgeschwächt werden. Ein Einfluss von HNF4 auf die Renin-Transkription, der noch durch Messungen von nativem Renin auf mRNA- und Proteinebene sowie ggf. *in vivo* bestätigt werden sollte, könnte weitere Erkenntnisse über die Funktion des PCT3B-Elementes und die Steuerung des proximal tubulären RAAS durch metabolische Faktoren wie die Fettsäuren bringen, da im proximalen Tubulus HNF4 in großer Menge und Renin co-exprimiert werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der polyungesättigten Omega3-Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n3) auf die Renin-Expression untersucht. Hier zeigten murine isolierte JG-Zellen in Kultur nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen EPA einen bis zu 0,24-fach verringerten Gehalt an Renin-mRNA (c(EPA)=100 μ M). Um den zugrunde liegenden Mechanismus über fettsäureabhängige Transkriptionsfaktoren oder den Prostaglandinstoffwechsel aufzuklären und die mögliche Rolle des Effektes im Rahmen der blutdrucksenkenden Wirkung von Omega3-Fettsäuren auszuleuchten, bedürfte es auch hier noch weiterer Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 1977;57(2):313–370.
2. Jensen C, Herold P, Brunner HR. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(5):399–410.
3. Antonaccio MJ. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1982;22:57–87.
4. Milan A, Caserta MA, Avenatti E, Abram S, Veglio F. Anti-hypertensive drugs and left ventricular hypertrophy: a clinical update. *Intern Emerg Med.* 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20480263>. Accessed August 5, 2010.
5. Vío CP, Jeanneret VA. Local induction of angiotensin-converting enzyme in the kidney as a mechanism of progressive renal diseases. *Kidney Int. Suppl.* 2003;(86):S57–63.
6. Nguyen G, Danser AHJ. Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp. Physiol.* 2008;93(5):557–563.
7. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer J-D. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J. Clin. Invest.* 2002;109(11):1417–1427.
8. Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J. Mol. Med.* 2008;86(6):615–621.
9. Ichihara A, Sakoda M, Kurauchi-Mito A, et al. New Approaches to Blockade of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Characteristics and Usefulness of the Direct Renin Inhibitor Aliskiren. *J Pharmacol Sci.* 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675959>. Accessed August 5, 2010.
10. Sarzani R, Salvi F, Dessì-Fulgheri P, Rappelli A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. *J. Hypertens.* 2008;26(5):831–843.
11. Gradman AH, Kad R. Renin inhibition in hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008;51(5):519–528.
12. Sielecki AR, Hayakawa K, Fujinaga M, et al. Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science.* 1989;243(4896):1346–1351.
13. Danser AHJ, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2005;6(3):163–165.

14. Talwalkar RT, Kotchen TA. Inhibition of renin by plasma linoleic acid. *Am. J. Med. Sci.* 1988;296(3):192–197.
15. Persson PB, Skalweit A, Thiele BJ. Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol. Scand.* 2004;181(4):375–381.
16. Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J. Clin. Invest.* 1997;100(6):1566–1574.
17. Persson PB, Skalweit A, Mrowka R, Thiele B-J. Control of renin synthesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003;285(3):R491–497.
18. Vander AJ. Control of renin release. *Physiol. Rev.* 1967;47(3):359–382.
19. Vallon V, Mühlbauer B, Osswald H. Adenosine and kidney function. *Physiol. Rev.* 2006;86(3):901–940.
20. DiBona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279(5):R1517–1524.
21. Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreasen D, Hansen PB, Skøtt O. Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ. Res.* 2002;90(9):996–1003.
22. Klar J. Zelluläre Mechanismen der Reningeregulation. 2003. Available at: <http://epub.uni-regensburg.de/10087/>. Accessed November 13, 2009.
23. Kurtz A, Penner R. Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989;86(9):3423–3427.
24. Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. *J. Physiol. (Lond.)*. 2003;552(Pt 3):667–671.
25. Kurtz A, Wagner C. Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am. J. Physiol.* 1998;275(6 Pt 2):F849–862.
26. Jensen BL, Schmid C, Kurtz A. Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):F659–669.
27. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A. Renin release. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:310–319.
28. Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F. The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ. Res.* 2006;99(11):1197–1206.

29. Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, et al. Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int.* 2007;72(7):814–822.
30. Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grünberger C, Kurtz A, Schweda F. Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ. Res.* 2007;100(4):556–563.
31. Haefliger J-A, Krattinger N, Martin D, et al. Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension. *J. Clin. Invest.* 2006;116(2):405–413.
32. Tamura K, Chen YE, Tanaka Y, et al. Nuclear receptor LXRalpha is involved in cAMP-mediated human renin gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2004;224(1-2):11–20.
33. Pinet F, Corvol MT, Bourguignon J, Corvol P. Isolation and characterization of renin-producing human chorionic cells in culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1988;67(6):1211–1220.
34. Sigmund CD, Okuyama K, Ingelfinger J, et al. Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J. Biol. Chem.* 1990;265(32):19916–19922.
35. Germain S, Philippe J, Fuchs S, Lengronne A, Corvol P, Pinet F. Regulation of human renin secretion and gene transcription in Calu-6 cells. *FEBS Lett.* 1997;407(2):177–183.
36. Steege A, Föhling M, Paliege A, et al. Wilms' tumor protein (-KTS) modulates renin gene transcription. *Kidney Int.* 2008;74(4):458–466.
37. Jackson K, Head GA, Morris BJ, et al. Reduced cardiovascular reactivity to stress but not feeding in renin enhancer knockout mice. *Am. J. Hypertens.* 2007;20(8):893–899.
38. Markus MA, Goy C, Adams DJ, Lovicu FJ, Morris BJ. Renin enhancer is crucial for full response in Renin expression to an in vivo stimulus. *Hypertension.* 2007;50(5):933–938.
39. Zhou X, Davis DR, Sigmund CD. The human renin kidney enhancer is required to maintain base-line renin expression but is dispensable for tissue-specific, cell-specific, and regulated expression. *J. Biol. Chem.* 2006;281(46):35296–35304.
40. Zhou X, Sigmund CD. Chorionic enhancer is dispensable for regulated expression of the human renin gene. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008;294(2):R279–287.
41. Chirgwin JM, Schaefer IM, Diaz JA, Lalley PA. Mouse kidney renin gene is on chromosome one. *Somat. Cell Mol. Genet.* 1984;10(6):633–637.

42. Miller CC, Carter AT, Brooks JI, Lovell-Badge RH, Brammar WJ. Differential extra-renal expression of the mouse renin genes. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(8):3117–3128.
43. Pan L, Gross KW. Transcriptional regulation of renin: an update. *Hypertension.* 2005;45(1):3–8.
44. Chirgwin JM, Schaefer IM, Rotwein PS, Piccini N, Gross KW, Naylor SL. Human renin gene is on chromosome 1. *Somat. Cell Mol. Genet.* 1984;10(4):415–421.
45. Germain S, Bonnet F, Philippe J, Fuchs S, Corvol P, Pinet F. A novel distal enhancer confers chorionic expression on the human renin gene. *J. Biol. Chem.* 1998;273(39):25292–25300.
46. Fuchs S, Philippe J, Germain S, et al. Functionality of two new polymorphisms in the human renin gene enhancer region. *J. Hypertens.* 2002;20(12):2391–2398.
47. Moore N, Dicker P, O'Brien JK, et al. Renin gene polymorphisms and haplotypes, blood pressure, and responses to renin-angiotensin system inhibition. *Hypertension.* 2007;50(2):340–347.
48. Mrowka R, Steinhage K, Patzak A, Persson PB. An evolutionary approach for identifying potential transcription factor binding sites: the renin gene as an example. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003;284(4):R1147–1150.
49. Pan L, Black TA, Shi Q, et al. Critical roles of a cyclic AMP responsive element and an E-box in regulation of mouse renin gene expression. *J. Biol. Chem.* 2001;276(49):45530–45538.
50. Petrovic N, Black TA, Fabian JR, et al. Role of proximal promoter elements in regulation of renin gene transcription. *J. Biol. Chem.* 1996;271(37):22499–22505.
51. Pan L, Xie Y, Black TA, Jones CA, Pruitt SC, Gross KW. An Abd-B class HOX.PBX recognition sequence is required for expression from the mouse Ren-1c gene. *J. Biol. Chem.* 2001;276(35):32489–32494.
52. Pan L, Jones CA, Glenn ST, Gross KW. Identification of a novel region in the proximal promoter of the mouse renin gene critical for expression. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2004;286(6):F1107–1115.
53. Morello F, de Boer RA, Steffensen KR, et al. Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *J. Clin. Invest.* 2005;115(7):1913–1922.
54. Todorov VT, Desch M, Schmitt-Nilson N, Todorova A, Kurtz A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is involved in the control of renin gene expression. *Hypertension.* 2007;50(5):939–944.
55. Todorov VT, Desch M, Schubert T, Kurtz A. The Pal3 promoter sequence is critical for the regulation of human renin gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Endocrinology.* 2008;149(9):4647–4657.

56. Sladek FM, Zhong WM, Lai E, Darnell JE. Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* 1990;4(12B):2353–2365.
57. Shi Q, Black TA, Gross KW, Sigmund CD. Species-specific differences in positive and negative regulatory elements in the renin gene enhancer. *Circ. Res.* 1999;85(6):479–488.
58. Ryan MJ, Black TA, Millard SL, Gross KW, Hajduczuk G. Endothelin-1 increases calcium and attenuates renin gene expression in As4.1 cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002;283(6):H2458–2465.
59. Sigmund CD. Regulation of renin expression and blood pressure by vitamin D(3). *J. Clin. Invest.* 2002;110(2):155–156.
60. Pan L, Wang Y, Jones CA, Glenn ST, Baumann H, Gross KW. Enhancer-dependent inhibition of mouse renin transcription by inflammatory cytokines. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005;288(1):F117–124.
61. Todorov V, Müller M, Schweda F, Kurtz A. Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2002;283(5):R1046–1051.
62. Todorov VT, Völkl S, Müller M, et al. Tumor necrosis factor-alpha activates NFkappaB to inhibit renin transcription by targeting cAMP-responsive element. *J. Biol. Chem.* 2004;279(2):1458–1467.
63. Shi Q, Gross KW, Sigmund CD. Retinoic acid-mediated activation of the mouse renin enhancer. *J. Biol. Chem.* 2001;276(5):3597–3603.
64. Liu X, Huang X, Sigmund CD. Identification of a nuclear orphan receptor (Ear2) as a negative regulator of renin gene transcription. *Circ. Res.* 2003;92(9):1033–1040.
65. Pan L, Glenn ST, Jones CA, Gronostajski RM, Gross KW. Regulation of renin enhancer activity by nuclear factor I and Sp1/Sp3. *Biochim. Biophys. Acta.* 2003;1625(3):280–290.
66. Adams DJ, Head GA, Markus MA, et al. Renin enhancer is critical for control of renin gene expression and cardiovascular function. *J. Biol. Chem.* 2006;281(42):31753–31761.
67. Mrowka R, Steege A, Kaps C, et al. Dissecting the action of an evolutionary conserved non-coding region on renin promoter activity. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(15):5120–5129.
68. Voigtländer T, Ganten D, Bader M. Transcriptional regulation of the rat renin gene by regulatory elements in intron I. *Hypertension.* 1999;33(1 Pt 2):303–311.

69. Voigtländer T, Ripperger A, Ganten D, Bader M. Transcriptional silencer in intron I of the rat renin gene. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995;377:285–292.
70. Lang JA, Ying LH, Morris BJ, Sigmund CD. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human renin gene expression in Calu-6 cells. *Am. J. Physiol.* 1996;271(1 Pt 2):F94–100.
71. Sinn PL, Sigmund CD. Human renin mRNA stability is increased in response to cAMP in Calu-6 cells. *Hypertension.* 1999;33(3):900–905.
72. Skalweit A, Doller A, Huth A, Kähne T, Persson PB, Thiele B-J. Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 3'-untranslated region. *Circ. Res.* 2003;92(4):419–427.
73. Hall RK, Sladek FM, Granner DK. The orphan receptors COUP-TF and HNF-4 serve as accessory factors required for induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92(2):412–416.
74. Kimura A, Nishiyori A, Murakami T, et al. Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic to hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4). *J. Biol. Chem.* 1993;268(15):11125–11133.
75. Malik S. Transcriptional regulation of the apolipoprotein AI gene. *Front. Biosci.* 2003;8:d360–368.
76. Erdmann D, Heim J. Orphan nuclear receptor HNF-4 binds to the human coagulation factor VII promoter. *J. Biol. Chem.* 1995;270(39):22988–22996.
77. Kurachi S, Furukawa M, Salier JP, et al. Regulatory mechanism of human factor IX gene: protein binding at the Leyden-specific region. *Biochemistry.* 1994;33(6):1580–1591.
78. Guo W, Chen M, Yen TS, Ou JH. Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promoter depends on both positive and negative regulation. *Mol. Cell. Biol.* 1993;13(1):443–448.
79. Yanai K, Hirota K, Taniguchi-Yanai K, et al. Regulated expression of human angiotensinogen gene by hepatocyte nuclear factor 4 and chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor. *J. Biol. Chem.* 1999;274(49):34605–34612.
80. Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21(4):1393–1403.
81. Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, et al. Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms in human and rats. *Nucl. Recept.* 2003;1(1):5.

82. Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M, Kahn A. Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J. Biol. Chem.* 1994;269(12):8944–8951.
83. Galson DL, Tsuchiya T, Tendler DS, et al. The orphan receptor hepatic nuclear factor 4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(4):2135–2144.
84. Duncan SA, Manova K, Chen WS, et al. Expression of transcription factor HNF-4 in the extraembryonic endoderm, gut, and nephrogenic tissue of the developing mouse embryo: HNF-4 is a marker for primary endoderm in the implanting blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(16):7598–7602.
85. Chen WS, Manova K, Weinstein DC, et al. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* 1994;8(20):2466–2477.
86. Yamagata K, Furuta H, Oda N, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature.* 1996;384(6608):458–460.
87. Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH. Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(14):6300–6303.
88. Qiu Y, Krishnan V, Pereira FA, Tsai SY, Tsai MJ. Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors and their regulation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1996;56(1-6 Spec No):81–85.
89. Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K, Sladek FM. Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(9):5131–5143.
90. Yuan X, Ta TC, Lin M, et al. Identification of an endogenous ligand bound to a native orphan nuclear receptor. *PLoS ONE.* 2009;4(5):e5609.
91. Ruse MD, Privalsky ML, Sladek FM. Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domain. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22(6):1626–1638.
92. Lee YK, Dell H, Dowhan DH, Hadzopoulou-Cladaras M, Moore DD. The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20(1):187–195.
93. Shimamoto Y, Hirota K, Fukamizu A. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on human angiotensinogen promoter. *Int. J. Mol. Med.* 2004;13(5):729–733.

94. Hertz R, Magenheim J, Berman I, Bar-Tana J. Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4 α . *Nature*. 1998;392(6675):512–516.
95. Rajas F, Gautier A, Bady I, Montano S, Mithieux G. Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 α . *J. Biol. Chem.* 2002;277(18):15736–15744.
96. Dhe-Paganon S, Duda K, Iwamoto M, Chi Y-I, Shoelson SE. Crystal structure of the HNF4 α ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J. Biol. Chem.* 2002;277(41):37973–37976.
97. Benoit G, Malewicz M, Perlmann T. Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol.* 2004;14(7):369–376.
98. Zheng Y, Li J, Ou J. Regulation of hepatitis B virus core promoter by transcription factors HNF1 and HNF4 and the viral X protein. *J. Virol.* 2004;78(13):6908–6914.
99. Kaps C. Untersuchung cis- und trans- modulatorischer Einflüsse einer konservierten nichtkodierenden DNA-Sequenz auf das humane Renin Gen. 2006.
100. Müller MWH, Todorov V, Krämer BK, Kurtz A. Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch.* 2002;444(4):499–505.
101. Itani H, Liu X, Sarsour EH, et al. Regulation of renin gene expression by oxidative stress. *Hypertension.* 2009;53(6):1070–1076.
102. Keen HL, Sigmund CD. Paradoxical regulation of short promoter human renin transgene by angiotensin ii. *Hypertension.* 2001;37(2 Part 2):403–407.
103. Todorov VT, Völkl S, Friedrich J, et al. Role of CREB1 and NF κ B-p65 in the down-regulation of renin gene expression by tumor necrosis factor α . *J. Biol. Chem.* 2005;280(26):24356–24362.
104. Chen LS, Cuddy MP, LaVallette LA. Regulation of human renin gene promoter activity: a new negative regulatory region determines the responsiveness to TNF α . *Kidney Int.* 1998;54(6):2045–2055.
105. Germain S, Konoshita T, Philippe J, Corvol P, Pinet F. 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.* 1996;316 (Pt 1):107–113.
106. Smith DL, Morris BJ, Do YS, Law RE, Shaw KJ, Hseuh WA. Identification of cyclic AMP response element in the human renin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;200(1):320–329.
107. Klar J, Sandner P, Müller MWH, Kurtz A. Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch.* 2002;444(3):335–344.

108. Nishiyama C, Hi R, Osada S, Osumi T. Functional interactions between nuclear receptors recognizing a common sequence element, the direct repeat motif spaced by one nucleotide (DR-1). *J. Biochem.* 1998;123(6):1174–1179.
109. Ying L, Morris BJ, Sigmund CD. 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.* 1997;272(4):2412–2420.
110. Tank JE, Henrich WL, Moe OW. Regulation of glomerular and proximal tubule renin mRNA by chronic changes in dietary NaCl. *Am. J. Physiol.* 1997;273(6 Pt 2):F892–898.
111. Chen M, Harris MP, Rose D, et al. Renin and renin mRNA in proximal tubules of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* 1994;94(1):237–243.
112. Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, Stahl RAK. Albumin up-regulates the type II transforming growth factor-beta receptor in cultured proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2004;66(5):1849–1858.
113. Tang SS, Jung F, Diamant D, et al. Temperature-sensitive SV40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* 1995;268(3 Pt 2):F435–446.
114. Yamaguchi S, Tamura K, Nyui N, et al. Developmental changes in expression of angiotensinogen mRNA in rat nephron segments. *Hypertens. Res.* 1998;21(3):155–161.
115. Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ. In situ hybridization evidence for angiotensinogen messenger RNA in the rat proximal tubule. An hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 1990;85(2):417–423.
116. Rambjør GS, Wålen AI, Windsor SL, Harris WS. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipids.* 1996;31 Suppl:S45–49.
117. Suresh Y, Das UN. Long-chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus. Effect of omega-3 fatty acids. *Nutrition.* 2003;19(3):213–228.
118. de Deckere EA. Possible beneficial effect of fish and fish n-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* 1999;8(3):213–221.
119. Skerrett PJ, Hennekens CH. Consumption of fish and fish oils and decreased risk of stroke. *Prev Cardiol.* 2003;6(1):38–41.
120. Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation.* 1993;88(2):523–533.
121. Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 2005;25:317–340.

122. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36(7):1187–1205.
123. Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J Am Coll Nutr.* 2004;23(1):71–78.
124. Smith WL. Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005;17(2):174–182.
125. Badalamenti S, Salerno F, Salmeron JM, et al. Lack of renal effects of fish oil administration in patients with advanced cirrhosis and impaired glomerular filtration. *Hepatology.* 1997;25(2):313–316.
126. Singer P, Melzer S, Goschel M, Augustin S. Fish oil amplifies the effect of propranolol in mild essential hypertension. *Hypertension.* 1990;16(6):682–691.

7 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die beim Zustandekommen der Arbeit beteiligt waren, meinen Dank aussprechen.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Mrowka für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung, große Offenheit auch für meine eigenen Ideen und Hypothesen und seinen fachlichen Rat bei der Planung der Experimente und Interpretation der Ergebnisse.

Für seine engagierte Unterstützung beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden, insbesondere in der Anfangsphase, sowie für fruchtbare Anregungen bei der Planung der Versuche danke ich Dr. Andreas Steege.

Dem gesamten Team des Institutes für vegetative Physiologie der Charité danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Beiträge, die wohl ein jeder durch kleine technische Hilfen oder interessante Gespräche geleistet hat. Im Speziellen danke ich Prof. Pontus Persson für die Möglichkeit, als Doktorand an seinem Institut tätig zu werden, Prof. Andreas Patzak und Dr. Michael Fähling für ihre Anmerkungen, Kommentare und Kritik sowie Frau Christine Reinhold für ihre technische Unterstützung, insbesondere bei der Erzeugung der HNF4-Mutationen. Herrn Axel Göhring und Herrn Frank Wenke danke ich für die kritische Lektüre des Manuskriptes.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Institutes für Physiologie der Universität Regensburg, die mich im Rahmen eines Gastaufenthaltes überaus freundlich aufgenommen haben. In diesem Rahmen konnte ich die Technik der JG-Zellpräparation erlernen und die Versuche zur Behandlung der JG-Zellkultur mit Eicosapentaensäure durchführen. Insbesondere danke ich Prof. Armin Kurtz für die Ermöglichung und Unterstützung dieses Aufenthaltes sowie PD Dr. Vladimir Todorov und Dr. Michael Desch für ihren fachlichen Rat und ihr großes Engagement bei der Vermittlung der experimentellen Techniken.

Für finanzielle Unterstützung während meiner experimentellen Arbeiten danke ich der Forschungsförderung der Charité und der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Schließlich danke ich meiner Frau Judica und meinen Kindern Maisha und Jakob für Geduld und Entbehrung einiger Zeit, die ich zum Fertigstellen der Arbeit benötigte. Meinen Eltern möchte ich danken für ihre Unterstützung meiner Forschungsfreisemester.

Publikation

Thomas Brinkmeier, Andreas Steege, Michael Föhling et al. Fatty acid dependent regulation of renin transcription by nuclear hormone receptor HNF-4. *The FASEB Journal*. 2008;22:735.9. (Abstract zum *Experimental Biology - Kongress, San Diego (USA) 2008*)

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Ich, Thomas Brinkmeier, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Molekulare Mechanismen der transkriptionellen Regulation des Renin-Gens" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 26.9.2012

Thomas Brinkmeier