

(Pro)reninrezeptor
eine neue Komponente des Renin-Angiotensin-Systems

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von
Sandra Feldt
aus Ueckermünde

eingereicht im Juli 2008

1. Gutachter: PD Dr. Dominik Müller

2. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

Disputation am 27.11.2008

1 Danksagung

Die vorliegende Dissertation habe ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der nephrologischen Abteilung von Prof. Dr. Luft in der Arbeitsgruppe Herz-Kreislaufforschung von PD Dr. Dominik Müller und PD Dr. Ralf Dechend an der Charité Campus Berlin Buch durchgeführt. Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ronald Gust für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Doktorarbeit am Institut für Pharmazie an der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Luft danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe erstellen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dominik Müller für die Vorgabe des interessanten Promotionsthemas und die stets zielgerichtete Betreuung meiner Arbeit. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Ich bedanke mich bei Dr. Maren Wellner für die Unterstützung bei der anfänglichen Themensuche und für die intensive Einarbeitung in die Laborpraktiken der Molekular-biologie.

Für die immer ausgesprochen angenehme Atmosphäre, die wertvollen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Ulrike Maschke.

Für die vielen interessanten Diskussionen und Gespräche danke ich Florian Herse, Claudia Eulenberg und Lydia Hering. Weiter danke ich Lydia Hering für das unermüdliche und kritische Korrekturlesen.

Für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag bedanke ich mich besonders bei Gabi N'diaye, Mathilde Schmidt, May-Britt Köhler, Ute Gerhard und Jana Czychi.

Dr. Jürgen Jahnke und Dr. Kerstin Gorzelniak danke ich für ihre Hilfe und wertvollen Ratschlägen bei den RT-PCR-Experimenten. Dr. Qadri Fatimunnisa danke ich für ihre Hilfe bei den Immunozytochemie-Experimenten.

Weiter danke ich Genevieve Nguyen, Aurelie Contrepas, Wendy Batenburg, Jan Danser und Michael Bader für die gute Kooperation innerhalb des (Pro)reninrezeptor-Projekts.

An allererster Stelle möchte ich jedoch meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund danken, die immer für mich da sind und die ich in allen Lebenssituationen an meiner Seite weiß.

2 Inhaltsverzeichnis

1	Danksagung.....	1
2	Inhaltsverzeichnis.....	2
3	Abkürzungsverzeichnis.....	5
4	Einleitung.....	7
4.1	Renin und Prorenin.....	7
4.1.1	Sekretion von Prorenin und Renin.....	7
4.1.2	Proteolytische und nicht-proteolytische Prorenin-Aktivierung.....	8
4.2	Das Renin-Angiotensin-System.....	10
4.2.1	klassisches RAS.....	10
4.2.2	Lokales Renin-Angiotensin System.....	11
4.3	(Pro)Reninrezeptor – eine neue Komponente des RAS.....	11
4.4	Handle Region Peptide.....	16
4.5	Aliskiren.....	19
4.6	Tiermodelle.....	20
4.7	Fragestellungen.....	24
5	Material.....	26
5.1	Gewebeisolierung.....	26
5.2	RNA-Isolierung.....	26
5.3	Bestimmung der RNA-Qualität.....	26
5.4	Bestimmung der RNA-Quantität.....	26
5.5	cDNA-Synthese.....	26
5.6	Real time quantitative PCR.....	26
5.6.1	Geräte.....	26
5.6.2	Software.....	26
5.6.3	Materialien und Reagenzien.....	27
5.6.4	Sequenzen der Primer und Sonden.....	28
5.7	Zellkultur.....	29
5.7.1	Zusätze für die Zellkultur.....	29
5.7.2	Stimulantien.....	29
5.7.3	Inhibitoren.....	30
5.7.4	Zellkulturmedien.....	30
5.7.5	Lösungen und Puffer.....	31
5.7.6	Zellen.....	31
5.8	Western Blot.....	32
5.8.1	Puffer und Lösungen.....	32
5.8.2	Antikörper.....	33
5.8.3	Material.....	33
5.8.4	Geräte.....	34
5.8.5	Software.....	34
5.9	Kinase-Assay.....	34
5.10	Durchflusszytometrie (FACS [®] , Fluorescence Activated Cell Sorting).....	34
5.10.1	Lösungen.....	34
5.10.2	Zellen.....	34
5.10.3	Markierungsreagenzien.....	34
5.10.4	Gerät.....	35
5.10.5	Software.....	35
5.11	Immunocytochemie.....	35
5.11.1	Mikroskop.....	35
5.11.2	Software.....	35
5.11.3	Antikörper.....	35
5.11.4	Material.....	35

5.12	Tierexperimente	35
6	Methoden.....	36
6.1	Gewebeisolierung.....	36
6.1.1	Homogenisierung von Rattengeweben.....	36
6.1.2	Isolierung von Glomeruli und Tubuli aus Rattennieren.....	36
6.2	Stimulationen von U937-Zellen und CASMC für RNA-Isolierungen.....	36
6.3	RNA-Isolierung.....	37
6.4	RNA-Quantifizierung mittels Nanodropmessung.....	39
6.5	RNA-Qualitätsprüfung mittels Bioanalyserchip	40
6.6	cDNA-Synthese.....	42
6.6.1	Protokoll.....	42
6.7	Real time quantitative PCR.....	43
6.7.1	Prinzip einer RT-PCR	43
6.7.2	Interkalierende Farbstoffe	44
6.7.3	Grundbegriffe	45
6.7.4	Minimierung von DNA-Kontaminationen.....	46
6.7.5	Primer- und Sondendesign	46
6.7.6	Optimale Primerkonzentrationen	47
6.7.7	Protokoll.....	48
6.7.8	PCR-Programme	49
6.7.9	Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse	49
6.8	Zellkultur.....	50
6.8.1	Einfrieren und Auftauen.....	50
6.8.2	Zellkultivierung.....	50
6.8.3	Passagieren.....	50
6.8.4	Bestimmung der Zellzahl	51
6.8.5	Stimulationen von U937-Zellen und CASMC für Proteinisolierungen.....	51
6.8.6	Zellyse.....	52
6.8.7	Proteinbestimmung mittels Bradford	53
6.9	Westernblotanalyse	54
6.9.1	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
6.9.2	Probenvorbereitung.....	55
6.9.3	Elektrophorese.....	55
6.9.4	Blotten	56
6.9.5	Ponceaufärbung.....	56
6.9.6	Blocken der Membran.....	57
6.9.7	Antikörperreaktionen	57
6.9.8	Antikörperdetektion	58
6.10	Kinase-Assay.....	58
6.10.1	Prinzip	59
6.10.2	Immunopräzipitation des immobilisierten Antikörpers	59
6.10.3	Kinase Assay	59
6.10.4	Western blot	59
6.11	Durchflusszytometrie (FACS [®] , Flourescence Activated Cell Sorting).....	60
6.11.1	Lokalisation des (P)RR in Monozyten und auf und in U937-Zellen	60
6.11.2	Bindung von FITC-HRP an U937-Zellen und an ES-Zellen.....	61
6.12	125I-Renin- und 125I-Proreninbindung in U937-Zellen	62
6.13	Tierversuche	62
6.13.1	Albuminmessung.....	62
6.13.2	Cystatin C-Messung.....	63
6.14	Immunocytochemie.....	63
7	Ergebnisse	64

7.1	In vitro-Experimente in humanen CASMC und U937-Zellen.....	64
7.1.1	(P)RR-mRNA-Expression in humanen U937-Zellen und CASMC	64
7.1.2	Die Expression des h(P)RR nach Stimulation mit Renin oder Prorenin.....	65
7.1.3	Lokalisation des h(P)RR in U937-Zellen.....	67
7.1.4	(Pro)renin-induzierte ERK-Signaltransduktion in U937-Zellen	69
7.1.5	Einfluß von EGF-Rezeptor auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen.....	70
7.1.6	Einfluß eines PKC $_{\alpha/\beta}$ -Blockers auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen	71
7.1.7	Einfluß eines MEK-Blockers auf die (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen	73
7.1.8	Einfluß von Mannose-6-phosphat-Rezeptor auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen	74
7.1.9	Einfluß von Aliskiren auf (Pro)renin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in U937-Zellen.....	75
7.1.10	Einfluß von HRP auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen	76
7.1.11	125I-Renin- und 125I-Proreninbindung an U937-Zellen.....	80
7.1.12	(Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in CASMC	81
7.1.13	Einfluß von Aliskiren auf (Pro)renin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in CASMC	84
7.1.14	Einfluß von HRP auf (Pro)renin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in CASMC	85
7.1.15	Einfluß eines MEK-Blockers auf die (Pro)renin-inuzierte ERK1/2-Phosphorylierung in CASMC.....	86
7.2	Vergleich der Wirkungen von Aliskiren und HRP in dTGR	87
7.2.1	Einfluß von Aliskiren und HRP auf Blutdruck und Sterblichkeit in dTGR.....	87
7.2.2	Einfluß von Aliskiren und HRP auf den Nierenschaden in dTGR	88
7.3	Untersuchung verschiedener Tiermodelle mit unterschiedlich aktiviertem RAS	90
7.3.1	Untersuchungen in sieben Wochen alten Ratten.....	90
7.3.2	Untersuchungen in 21 Wochen alten Ratten	100
8	Diskussion	104
8.1	Lokalisation des (P)RR	104
8.2	ERK-Aktivierung in U937-Zellen und CASMC.....	105
8.3	Angiotensin II-unabhängige (Pro)renin-induzierte ERK-Aktivierung	106
8.4	Wirkungen von Aliskiren in vivo.....	107
8.5	Wirkungen von Aliskiren in vitro	110
8.6	HRP, ein spezifischer (P)RR-Blocker.....	111
8.6.1	Prorenin-Aktivierung	111
8.6.2	HRP verbessert den Organschaden in vielen Tiermodellen.....	112
8.7	mRNA-Expression des (P)RR.....	116
9	Ausblick	120
10	Zusammenfassung.....	122
11	Abstract	124
12	Literaturverzeichnis.....	126
13	Publikationsverzeichnis.....	131
14	Vorträge.....	133
15	Posterpräsentationen.....	133
16	Lebenslauf.....	134

3 Abkürzungsverzeichnis

(P)RR	(Pro)Reninrezeptor
2K1C	two-kidney one-clip
A-MSH	α -Melanocyte-Stimulating Hormone
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AgRP	Agouti-related peptide
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
AOGEN	Angiotensinogen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP6AP2	adaptor protein type II for vacuolar H ⁺ -ATPase
AT1R	Typ 1 Angiotensin II Rezeptor
AT2R	Typ 2 Angiotensin II Rezeptor
BSA	Bovine serum albumin
CART	Cocaine- und Amphetamine-regulated transcript
CASMC	coronary artery smooth muscle cells
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese Hamster Ovary
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTGR	doppel transgene Ratten
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FCS	fetal calf serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GTC	Guanidinisothiocyanat
h	human
HRP	Handle Region Peptide
kD	Kilodalton
M6PR	Mannose-6-Phosphate Receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen activated, ERK activating kinase
Min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Ngal	Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin
NPY	Neuropeptid Y
NTC	non template control
OD	optische Dichte
Ob-Rs	Rezeptoren für Leptin (Obese Receptors)
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PKC	Protein Kinase C
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
POMC	Proopiomelanocortin
PRA	Plasma-Reninaktivität
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure
RnBP	Renin binding protein
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real time Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SHR	spontaneously hypertensive rats
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V-ATPase	vakuoläre H ⁺ -ATPase
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
β -ME	β -Mercaptoethanol

4 Einleitung

4.1 Renin und Prorenin

4.1.1 Sekretion von Prorenin und Renin

Renin wurde vor 100 Jahren entdeckt und in einer Pionierarbeit von R. Tigerstedt und P.G. Bermann beschrieben. Sie nahmen frische Kaninchennieren, zerrieben sie mit Glaspulver in physiologischer Kochsalzlösung, filterten und spritzten den Extrakt einem gesunden Kaninchen in die Vena jugularis. Bei dem Tier erhöhte sich innerhalb von 80 Sekunden der Blutdruck um etwa 50%. Sie nannten den neu entdeckten Stoff „Renin“. Den pathophysiologischen Aspekt der Renin-Ausschüttung für den Bluthochdruck beschrieb Tigerstedt schon vor hundert Jahren mit erstaunlicher Genauigkeit [1]. Heute, mehr als 100 Jahre später, ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Renin immer noch nicht vollständig erforscht.

Renin ist eine Aspartylprotease, die in den Nieren in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates (granulierte epitheloide Zellen) gebildet wird. Es wird bei niedrigem Blutdruck und geringem Natriumgehalt der Niere ausgeschüttet. Auch Katecholamine können durch β -Adrenorezeptoren zu einer erhöhten Reninfreisetzung führen. Zusammenfassend reguliert Renin langfristig den Blutdruck und wirkt einem starken Blutdruckabfall entgegen.

Renin ist aus zwei homologen Schleifen aufgebaut; im Spalt zwischen den beiden Schleifen liegt das aktive Zentrum mit zwei katalytischen Aspartatgruppen. Renin ist monospezifisch und spaltet nur Angiotensinogen (AOPEN).

Die inaktive Vorstufe, Prorenin, ist mit einem zusätzlichen N-terminalen Propeptid mit einer Länge von 43 Aminosäuren ausgestattet, das den enzymatisch aktiven Spalt im Molekül bedeckt und damit den Zugang von AOPEN zum aktiven Spalt von Renin verhindert. Prorenin zirkuliert im Plasma aus unbekanntem Gründen in einer Konzentration, die manchmal bis zu 100 mal höher ist, als die Konzentration von Renin [2].

4.1.2 Proteolytische und nicht-proteolytische Prorenin-Aktivierung

Die Proteolytische Aktivierung beinhaltet das Abspalten des Prosegments. In vivo erfolgt die proteolytische Aktivierung von Prorenin in der Niere. Umwandlungsenzyme sind Prokonvertase 1 und Cathepsin B [3, 4]. Dieses aktive Renin wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere gespeichert und kann akut freigesetzt werden. Chronische Stimulation führt dagegen vorwiegend zur Freisetzung von Prorenin [5].

Die Nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin ist ein reversibler Prozeß. Er beinhaltet ein Herausfallen des Propeptids aus dem enzymatischen Spalt und erfolgt in 2 Schritten [6].

1. Das Propeptid bewegt sich aus dem enzymatischen Spalt.
2. Der Reninteil des Moleküls nimmt seine enzymatisch aktive Konformation ein.

In vitro kann die nichtproteolytische Aktivierung durch einen niedrigen pH-Wert (optimaler pH-Wert 3,3) und Kälte induziert werden [7, 8].

Säureaktivierung führt zur vollständigen Aktivierung von Prorenin, Kryoaktivierung zur teilweisen (rund 15 %) Aktivierung. Nichtproteolytisch aktiviertes Prorenin ist enzymatisch voll aktiv und kann durch monoklonale Antikörper erkannt werden, die spezifisch gegen das aktive Zentrum von Renin gerichtet sind. Wird Prorenin einem Renininhibitor ausgesetzt und anschließend ein Antikörper inkubiert, der gegen das Prosegment gerichtet ist, kann das Prosegment immer noch nachgewiesen werden [6, 9]. Somit bewirken niedriger pH-Wert und Kälte eine nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin. Bei Zusatz eines Renininhibitors ist dieses nichtproteolytisch aktivierte Prorenin natürlich enzymatisch inaktiv, da das aktive Zentrum mit dem Renininhibitor blockiert wird.

Kinetische Untersuchungen zur nichtproteolytischen Aktivierung deuten an, dass zwischen der geschlossenen (inaktiven) Form und der offenen (aktiven) Form ein Gleichgewicht existiert. Der Inaktivierungsschritt ist temperaturabhängig und erscheint sehr schnell bei 37 °C und neutralem pH-Wert [10]. Demzufolge liegt unter physiologischen Bedingungen nur ein kleiner Prozentsatz (<2 %) von Prorenin in der offenen aktiven Form vor. Bei Einsatz eines Renininhibitors wird das Gleichgewicht beeinflusst, da diese Arzneistoffgruppe durch ihre hohe Affinität zum aktiven Zentrum die Inaktivierung verhindert und das Gleichgewicht zur offenen aber inaktiven Form verschiebt.

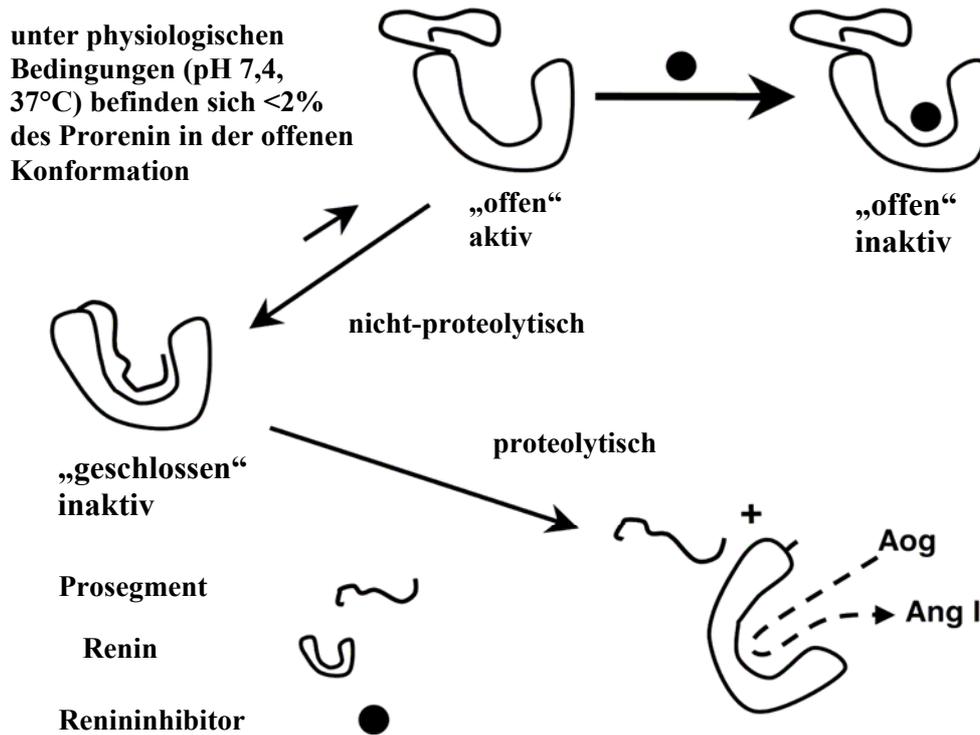


Abbildung 1: proteolytische und nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin

Der Renininhibitor bindet an Prorenin, wenn Prorenin in seiner offenen Konformation vorliegt. Nach Bindung kann das Prosegment nicht in seine geschlossene Position zurück. Das Gleichgewicht wird in Richtung der offenen Konformation verschoben. Bei der proteolytischen Aktivierung wird das Prosegment abgespalten und das Substrat AOPEN hat Zugang zum enzymatischen Spalt. (verändert nach Danser AH, Deinum J)

4.2 Das Renin-Angiotensin-System

4.2.1 klassisches RAS

Renin setzt eine Kaskade in Gang, die in mehreren Schritten zum Effektorpeptid Angiotensin II führt:

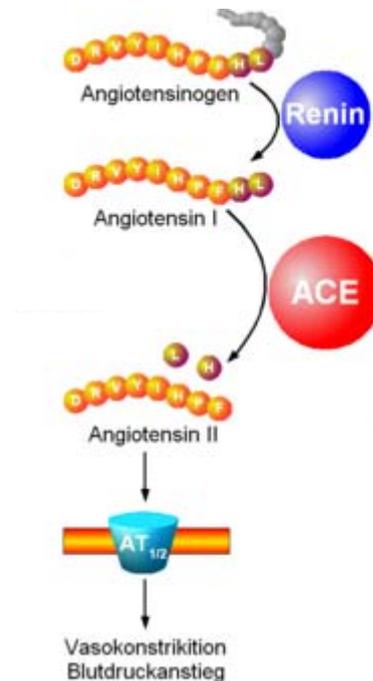


Abbildung 2: schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems

Renin spaltet AOPEN zu Angiotensin I. Dieses wird durch ACE in Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II vermittelt durch Wechselwirkung mit dem AT1-Rezeptor Vasokonstriktion mit Blutdruckanstieg, renale Natriumreabsorption, Zellproliferation und Stimulation der Aldosteronfreisetzung.

Als Protease wandelt Renin AOPEN, welches aus der Leber kommt, in Angiotensin I um. Dieses wiederum wird durch ACE (Angiotensin Converting Enzyme) in Angiotensin II umgewandelt, welches negativ rückkoppelnd auf die Reninbildung wirkt und somit eine Reninüberproduktion verhindert. Die Mehrheit der Angiotensin II-Wirkungen wird über den AT1-Rezeptor vermittelt. Angiotensin II-AT1-Rezeptorinteraktion bewirkt glatte Muskelzellkontraktion in den Gefäßen, Aldosteronfreisetzung mit Natrium- und Wasserretention und Kaliumausscheidung, Durst, hohen Blutdruck und Tachykardie [11].

Bei Nierenerkrankungen, die die Durchblutung senken wie Stenosen und Arteriosklerose, wird zuviel Renin gebildet, was sich in einer Erhöhung des Blutdruckes, einer arteriellen Hypertonie, äußert.

4.2.2 Lokales Renin-Angiotensin System

Die Existenz eines lokalen kardiovaskulären Renin-Angiotensin-Systems (RAS) dient als Erklärung der Langzeitwirkungen der RAS-Inhibitoren bei Herzinsuffizienz und Hypertonie.

Von einem lokalen RAS darf gesprochen werden, wenn die RAS-Komponenten, die für die Angiotensin II-Synthese notwendig sind, also Renin, AOPEN und ACE, lokal synthetisiert werden oder durch Aufnahme lokal wirken.

Das intrarenale RAS ist das erste lokale RAS, das beschrieben wurde. Alle Komponenten des RAS sind in der Niere vorhanden und jeweils in bestimmten Kompartimenten spezifisch lokalisiert [12-15]. Die Angiotensin II-Konzentrationen in der renalen interstitiellen Flüssigkeit sind 1000fach höher als im Plasma. Daraus lässt sich ableiten, dass das intrarenale Angiotensin II in der Niere gebildet wird [16].

Renin-mRNA ist im Herzen nur in geringen Mengen beziehungsweise nicht nachweisbar. Kardiale Membranen sind in der Lage, Renin zu binden. Kardiale Gewebespiegel von Renin, Angiotensin I und II, aber nicht von AOPEN, korrelieren direkt mit den entsprechenden Plasmaspiegeln. Sowohl im Herzgewebe als auch im Plasma waren die Spiegel nach bilateraler Nephrektomie nicht mehr nachweisbar. Daher scheint es, dass Renin im Herzen aus der Niere kommt und die kardiale Angiotensinbildung von renalem Renin abhängt [17, 18].

Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und endokardiale Zellen bilden Angiotensin I und II.

Auch hier wird Renin nicht lokal synthetisiert, sondern über die Zellen aus dem Plasma aufgenommen [17].

4.3 (Pro)Reninrezeptor – eine neue Komponente des RAS

Die Existenz eines lokalen RAS unabhängig vom zirkulierenden RAS hat die Suche nach zellulären Bindungsstellen für AOPEN und Renin veranlasst. Damit soll ihre Aufnahme ins Gewebe erklärt werden.

Es sind 2 Rezeptoren, die mit ähnlicher Affinität Renin und Prorenin binden, identifiziert worden: der Mannose-6-phosphat-Rezeptor (M6PR) und der (Pro)reninrezeptor ((P)RR).

Der **M6PR** ist ein Clearancerezeptor, der ausschließlich glykosylierte Formen von Renin und Prorenin bindet. Nach der Bindung kommt es zur Internalisierung und Degradation. Die intrazelluläre Proteolyse von Prorenin zu Renin bewirkt keine Bildung von intrazellulärem Angiotensin I oder II [19-21].

Im Jahre 2002 wurde das RAS um eine Komponente, den **(P)RR**, erweitert. Im Gegensatz zum M6PR wird das an den (P)RR gebundene Renin oder Prorenin nicht internalisiert oder degradiert. Nguyen et al haben den (P)RR auf humanen Mesangialzellen in Zellkultur identifiziert. Reninbindung induziert eine Hypertrophie und einen Anstieg in Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) -Synthese [22, 23].

Dieser Rezeptor ist geklont worden nach dem Screening einer humanen adulten Nieren-Expressionsbibliothek mit ¹²⁵I-Renin [24]. (P)RR/ATP6AP2 ist ein 350-Aminosäuren langes Protein mit einer einzelnen Transmembrandomäne, mit einer unglykosylierten hoch hydrophoben N-terminalen Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz. Die Bindung an den (P)RR ist spezifisch für Renin und Prorenin. Im Folgenden werden Renin und Prorenin unter der Bezeichnung (Pro)renin zusammengefasst. Rezeptor-gebundenes Renin besitzt eine 5fach höhere katalytische Aktivität. Bei Proreninbindung erreicht Prorenin volle enzymatische Aktivität vergleichbar mit jener von Renin in Lösung. Die Aktivierung von Renin und Prorenin wird mit einer Konformationsänderung nach Bindung an den Rezeptor erklärt. Zusätzlich induziert Reninbindung intrazellulär die Aktivierung der Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) p44 (ERK1)/p42(ERK2) [24].

MAPK sind Kinasen, die auf unterschiedlichste Stimuli hin aktiviert d. h. phosphoryliert werden und durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression neuer Gene führen. Es gibt 4 Hauptgruppen von MAPK. Es sind ERK, JNK, p38 und ERK5.

Signale von Zelloberflächenrezeptoren werden direkt oder über G-Proteine zu einer Reihe von Proteinkinasen weitergeleitet, die diese Signale amplifizieren. Die erste Aktivierungsstufe beinhaltet die MAP4K-Proteine, die nächste Stufe MAP3K-Proteine, wie Raf, TAK, ASK und MEKK1. Die MAP2K-Proteine, wie MKK und MEK-Kinasen phosphorylieren dann die MAPK JNK1, p38 oder ERK. Die MAPK geben der jeweiligen Kaskade den entsprechenden Namen. Die MAPK aktivieren Proteinkinasen (MAPKAPK) und viele Transkriptionsfaktoren. Diese regulieren Gene der Apoptose, der Entzündung, des Zellwachstums und der Differenzierung.

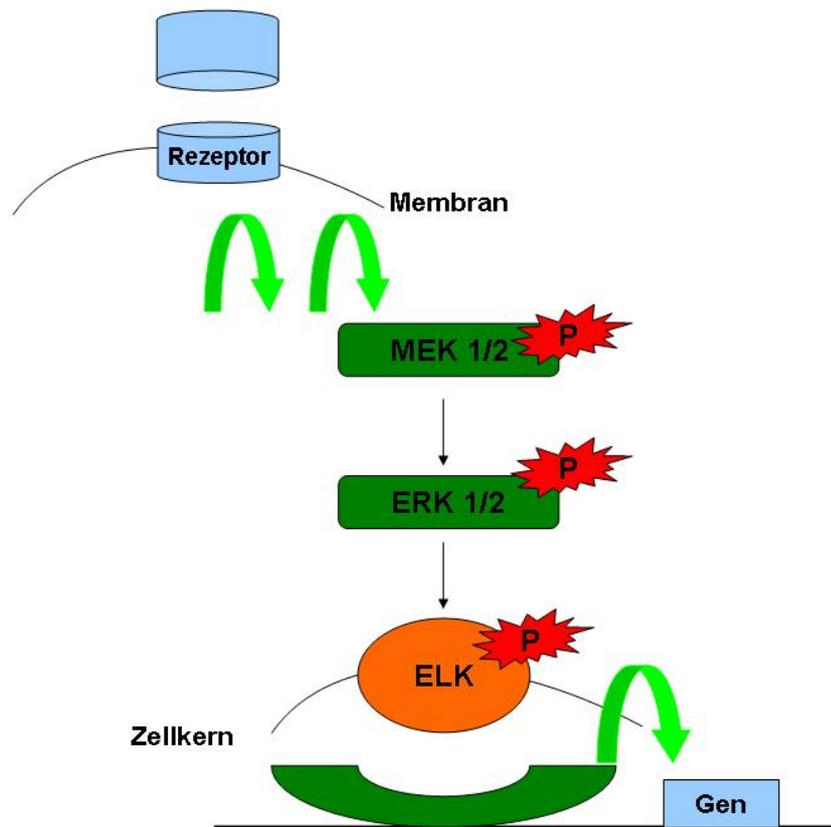


Abbildung 3: Die MAPK-Signalkaskade

Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es über verschiedene Zwischenstufen zur Phosphorylierung von MEK. MEK phosphoryliert ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase). Phosphoryliertes ERK wandert in den Zellkern und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor ELK. Dieser aktivierte Transkriptionsfaktor beeinflusst dann die Expression verschiedener Gene.

In humanen adulten Geweben kann (P)RR-mRNA im Herzen, Gehirn und in Niere, Leber und Plazenta detektiert werden. Immunofluoreszenzstudien in gesunden humanen Nieren- und Herzgeweben zeigen, dass der (P)RR in glomerulären Mesangialzellen und in VSMC von renalen kortikalen Arterien und Koronararterien vorkommt [24].

Ramser et al haben eine spezifische Rolle des (P)RR für kognitive Funktionen und die Gehirnentwicklung gezeigt. Patienten mit einer Mutation im (P)RR-Gen leiden an X-Chromosomen gekoppelter mentaler Retardierung und Epilepsie. Sie haben keine kardiovaskulären oder renalen Störungen. Die Mutation besteht in einer Löschung von Exon 4 bei 50 % der (P)RR-mRNA. Obwohl der Rezeptor Renin immer noch binden kann und auch die katalytische Aktivität von Renin steigert, führt Reninbindung hier nicht zur MAPK-Aktivierung [25]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Aktivierung von ERK durch den (P)RR wichtig ist für die Gehirnentwicklung und für den Erhalt der normalen neurologischen Funktionen und dass diese Prozesse unabhängig sind vom RAS.

Burcklé et al haben bei Untersuchungen zur Struktur des (P)RR gefunden, dass der N-terminale Teil des (P)RR, der der extrazellulären Domäne entspricht, eine hohe Aminosäureidentität nur in Vertebraten hat. Im Gegensatz dazu ist der C-terminale Teil des Rezeptors, der dem Transmembranteil entspricht, hoch konserviert in Vertebraten und Invertebraten. Beide Teile haben unterschiedliche evolutionäre Ursprünge. Die N-terminale Domäne ermöglicht Reninbindung. Daneben steht die ältere konservierte Funktion für die C-terminale Transmembrandomäne [26]. Durch diese evolutionär konservierte C-terminale Domäne könnte der (P)RR in Prozessen beteiligt sein, die mit dem RAS nicht verwandt sind. Tatsächlich sind andere Funktionen für (P)RR schon vermutet worden. So ist ein verkürzter Teil von (P)RR bereits früher beschrieben und als M8-9-Protein bezeichnet worden. Dieses M8-9-Protein ist in Nebennierenmembranen vom Rind als assoziiertes Protein zur V_0 -Untereinheit der vakuolären H^+ -ATPase identifiziert worden [27]. Interessanterweise ist dieses Protein identisch mit der evolutionär konservierten C-terminalen Domäne. Nach einer Nomenklaturberichtigung wird das Protein jetzt ATP6AP2 (adaptor protein type II for vacuolar H^+ -ATPase) genannt. (P)RR ist also ein zur V-ATPase assoziiertes Protein. Es wird angenommen, dass der Hauptteil des Rezeptors intrazellulär lokalisiert ist. Allerdings ist das intrazelluläre Kompartiment, das das Protein trägt, noch nicht spezifiziert worden.

Eine Beteiligung von (P)RR in Renin-unabhängigen basalen zellulären Funktionen wird unterstützt durch die folgenden Beobachtungen. Zebrafische, die mutierten (P)RR tragen, zeigen frühe Entwicklungsabnormalitäten, die besonders die Augen betreffen. Weiter sind sie hypopigmentiert. Es kommt zu neuronalem Zelltod und sie sterben früh in der Entwicklung [28]. Dieser Phänotyp ähnelt den Zebrafischmutanten, die Mutationen in Untereinheiten der vakuolären H^+ -ATPase aufweisen [29]. Das lässt eine Interaktion von (P)RR mit diesem Komplex vermuten.

Huang et al unterstützen eine Rolle von (P)RR-Aktivierung als Pathomechanismus für glomeruläre Fibrose. Sie haben gezeigt, dass die Aktivierung des (P)RR die TGFbeta1-Synthese in humanen und Ratten-Mesangialzellen erhöht. Diese Hochregulation von TGFbeta1 ist teilweise verantwortlich für die gesteigerte Synthese von PAI-1 und von fibrotischen Matrixkomponenten wie Fibronectin und Kollagen I. Mittels der siRNA-Technik haben sie die (P)RR-Genexpression gehemmt und gezeigt, dass der Anstieg von TGFbeta1 auf eine Aktivierung des (P)RR zurückzuführen ist. Weiter haben sie nachgewiesen, dass die TGFbeta1-Aktivierung durch die vorhergehende ERK-Phosphorylierung bedingt ist [30, 31].

Unger et al haben in Zellkulturexperimenten in humanen Kardiomyoblasten und in HEK-Zellen eine Wechselwirkung von (P)RR mit PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger protein) nachgewiesen. Die C-terminale zytoplasmatische Region des (P)RR ist Interaktionsdomäne für PLZF. In HEK293-Zellen haben sie gefunden, dass eine (P)RR-Stimulation mit Renin zur Herunterregulation der (P)RR-mRNA über den Transkriptionsfaktor PLZF um 50 % führt. Inverse Effekte haben sie für PI3K-p85alpha beobachtet, welche positiv reguliert wird durch PLZF. (P)RR-Stimulation mit Renin verursacht einen Anstieg um 45 % in der PI3K-p85alpha-Promotoraktivität verglichen mit Kontrollen. Diese Wirkung wird wiederum verhindert durch Hemmung von (P)RR mit siRNA. Auch in Kardiomyoblasten ist (P)RR mRNA um 50 % erniedrigt nach Reninstimulation. Gleichzeitig kommt es zu einer Steigerung der PI3K-p85alpha-mRNA auf 224,2 % nach Reninstimulation. Weiter kann es in Kardiomyoblasten aufgrund des postulierten Mechanismus Proliferation und Apoptosehemmung nachgewiesen werden [32].

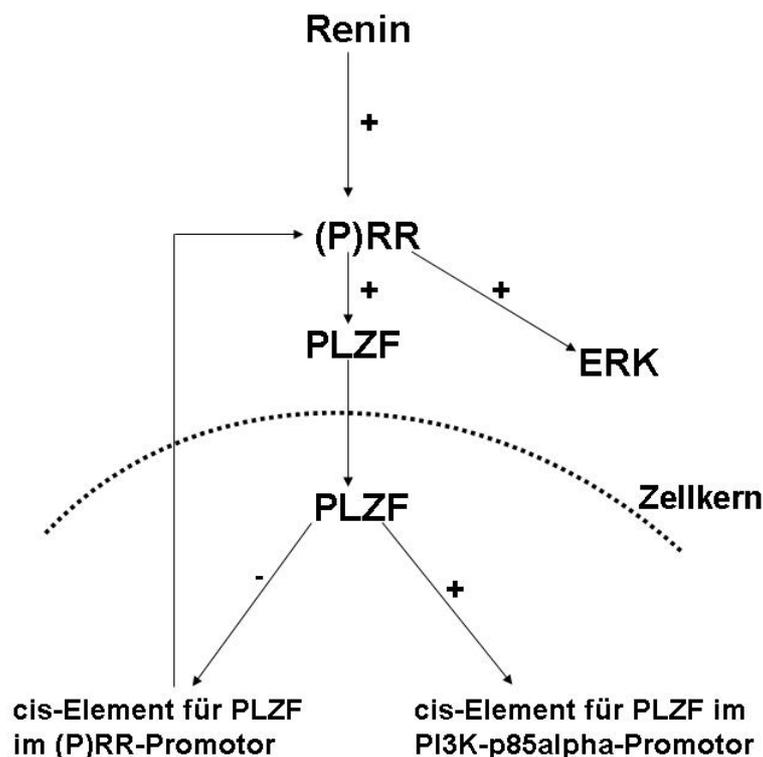


Abbildung 4: Signaltransduktion des (P)RR über PLZF

Die Bindung von Renin an (P)RR bewirkt eine Aktivierung von PLZF. PLZF wandert in den Zellkern und bewirkt dort die Herunterregulation der (P)RR-mRNA-Expression und eine Hochregulation der mRNA-Expression der PI3K-p85alpha-Untereinheit. Dadurch kommt es zur Apoptosehemmung und Proliferation in Kardiomyoblasten.

Der Rezeptor könnte dazu beitragen, die lokale Bildung von Angiotensin II, unabhängig vom zirkulierenden RAS zu erklären. Die physiologische Plasmakonzentration von Renin liegt im picomolaren Bereich, aber in Geweben, besonders in intestinalen Flüssigkeiten kann die Reninkonzentration 10 nM erreichen. Insgesamt wird die katalytische Aktivität von (P)RR-gebundenem Renin um das 5fache erhöht, was andeutet, dass die Zelloberfläche ein wichtiger Ort für AOPEN-Aktivierung und Angiotensin II-Bildung ist.

Dieser Rezeptor stellt eine funktionelle Rolle von Prorenin zur Verfügung und könnte helfen, die physiologische und pathophysiologische Rolle von erhöhten Proreninspiegeln und die lokale Aktivierung des RAS zu verstehen.

Wenn der Rezeptor pathophysiologisch relevant ist, könnten (P)RR-Blocker eine neue Möglichkeit darstellen, das RAS am Anfang zu hemmen. Damit würden die lokale Synthese von Angiotensin II und die direkte Zellaktivierung von Renin und Prorenin verhindert werden.

4.4 Handle Region Peptide

Suzuki et al haben in vitro durch den Gebrauch Regionen-spezifischer Antikörper gezeigt, dass die Prosegmentsequenz des Proreninmoleküls eine Schlüsselrolle in der Bindung von spezifischen Proteinen spielt und diese „Handle Region“ genannt [8].

Die Handle-Region des Prosegments soll laut dieser Autoren auch für die Bindung von Prorenin an den (P)RR verantwortlich sein. Bei dieser Bindung wird die Dissoziation der Gate-Region des Prosegments vom enzymatischen Spalt von Prorenin provoziert. Prorenin wird dadurch nichtproteolytisch aktiviert. Ein Peptid mit dieser Handle-Region-Struktur müsste kompetitiv an den (P)RR binden und die nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin hemmen. Ein solches Handle-Region Peptid (HRP) wurde von Ichihara et al entwickelt und verbessert den Herz- und Nierenschaden in verschiedenen Tiermodellen [33-38]. Dieses Peptid soll also die erste Substanz mit (P)RR-blockierenden Eigenschaften sein.

Als diabetische Nephropathie bezeichnet man eine progressive Nierenerkrankung, die aufgrund einer Angiopathie der Kapillaren des Nierenkörperchen auftritt. Es kommt zur Entwicklung einer Proteinurie. Das charakteristische histologische Merkmal ist eine knötchenförmige Bindegewebsvermehrung, die zur Glomeruloskleroseentwicklung beiträgt. Ursache der diabetischen Nephropathie ist ein vorangehender Diabetes mellitus. Viele Patienten mit Diabetes haben starke Anstiege in der Plasmakonzentration von Prorenin, welche oft mit mikrovaskulären Komplikationen assoziiert ist [39]. Bisher ist aber nicht

bekannt über welchen Mechanismus Prorenin zu mikrovaskulären Komplikationen bei Diabetes beitragen kann. Die Aktivierung von Prorenin über den (P)RR könnte dafür einen neuen Erklärungsansatz bieten. Falls Prorenin über den (P)RR zur diabetischen Nephropathieentstehung beiträgt, könnte die Hemmung der Aktivierung von Prorenin am (P)RR zur Hemmung der Entwicklung der diabetischen Nephropathie führen. Die Hemmung der Aktivierung von Prorenin am (P)RR soll durch HRP erreicht werden. Ichihara et al haben in Sprague Dawley (SD) Ratten durch die Anwendung von Streptozotozin Diabetes induziert. Diese Tiere haben hohe Proreninspiegel. Durch die Anwendung von HRP kann in diesen Tieren die Proteinurie und Glomerulosklerose verbessert werden. Die Autoren führen diese Besserung durch HRP auf die Hemmung der nichtproteolytischen Aktivierung von Prorenin am (P)RR zurück. Dadurch werden die Aktivierung des renalen RAS und der Nierenschaden in diesen diabetischen Ratten verhindert. Plasma-Prorenin, Angiotensin I- und -II-Spiegel werden nicht beeinflusst [34].

In spontan-hypertensiven Ratten (SHR) haben Ichihara et al gezeigt, dass auch hier HRP die kardiale Fibrose, die Ventrikelgröße und das Herzgewicht im Vergleich zu unbehandelten SHR-Ratten vermindert. Wieder schlagen sie vor, dass eine Hemmung der nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin und eine daraus resultierende verminderte Aktivierung des kardialen RAS durch HRP für diese Besserung verantwortlich ist [36].

Im gleichen Modell haben sie durch HRP-Behandlung das Fortschreiten der Proteinurie und Glomerulosklerose in der Rattenniere verhindert [35]. Sie glauben, dass auch diese Verbesserung durch die Hemmung der nichtproteolytischen Aktivierung von Prorenin am (P)RR und folgende Hemmung der Aktivierung des renalen RAS erreicht wird.

In einem weiteren Experiment sind AT1a-Rezeptor knockout-Mäuse mit Streptozotozin diabetisch gemacht und entweder mit HRP oder ACE-Inhibitor oder beidem behandelt worden. Diabetische AT1a-ko-Mäuse zeigen im Vergleich zu diabetischen Wildtypmäusen eine verzögerte Glomerulosklerose und Proteinurie. HRP unterdrückt die Proteinurie und die Glomerulosklerose in diabetischen AT1a-ko-Mäusen, die mit ACE-Inhibitor behandelt worden sind. HRP-Behandlung verringert in der Niere diabetischer AT1a-ko-Mäuse die Phosphorylierungen von ERK, p38 und c-JNK [33]. In diesem Modell sind also die Schädigungen nicht durch Prorenin-vermittelte Aktivierung des renalen RAS bedingt, sondern durch die gesteigerte Prorenin/(P)RR-Signaltransduktion.

In transgenen Ratten, die humanen (P)RR überexprimieren, entwickeln sich Glomerulosklerose und Proteinurie in der 28. Lebenswoche. HRP verbessert die

Glomerulosklerose und Proteinurie, verringert die MAPK-Aktivierung und die erhöhte Expression von TGFbeta1. Überexpression von humanem (P)RR führt zu einer langsam fortschreitenden Nephropathie durch Angiotensin II-unabhängige-MAPK-Aktivierung in Ratten. Weiter zeigt dieses Experiment, dass die Spezies-Spezifität für die durch (Pro)renin/(P)RR-Wechselwirkung bedingte MAPK-Aktivierung nicht wichtig ist [38].

In einer weiteren Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, ob nichtproteolytisch aktiviertes Prorenin am Fortschreiten der Nephropathie beteiligt ist. Das Fortschreiten der Proteinurie und Glomerulosklerose in diabetischen SD-Ratten wird durch einen ACE-Inhibitor abgeschwächt und durch HRP vollständig gehemmt. HRP verhindert also auch das Fortschreiten einer schon bestehenden Nephropathie [37].

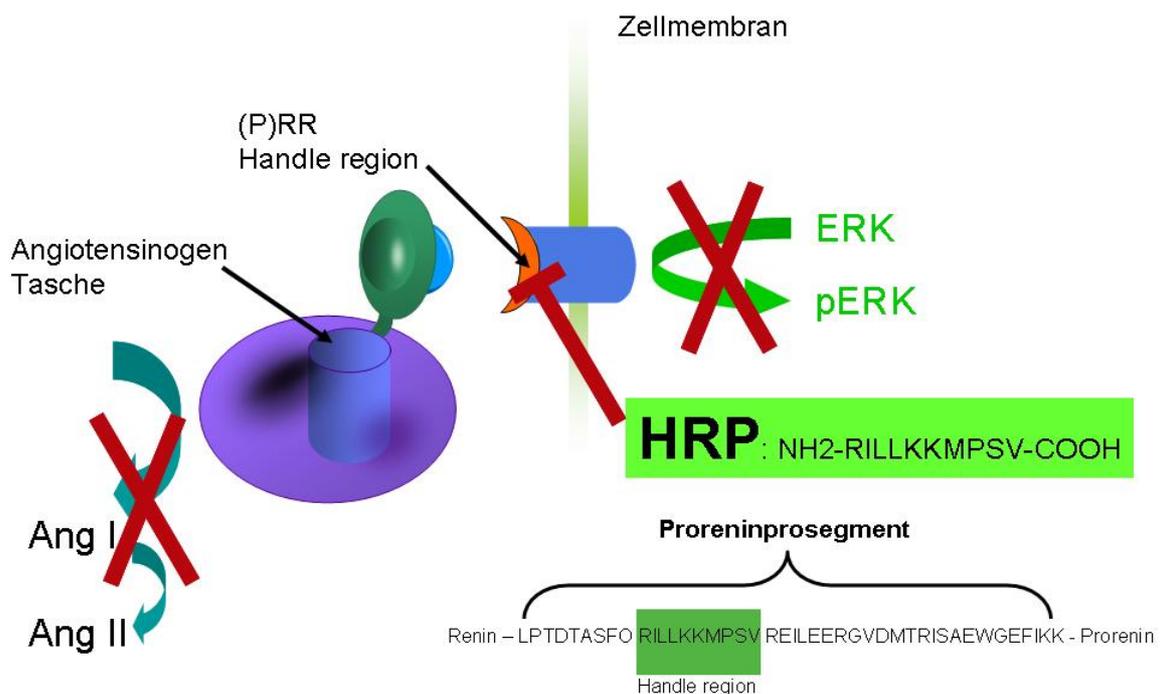


Abbildung 5: Hemmung der nichtproteolytischen Aktivierung von Prorenin am (P)RR durch HRP

Prorenin bindet mit der Handle-Region des Prosegments an den (P)RR und wird nichtproteolytisch aktiviert. Dadurch kommt es zur Prorenin-induzierten Aktivierung des RAS und zur Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung. HRP, ein kleines Peptid mit der Aminosäuresequenz der Handle-Region, soll besser an (P)RR binden als das Prosegment von Prorenin und verhindert dadurch Prorenin-induzierte RAS-Aktivierung und Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung. In dieser Abbildung ist die Ratten-Sequenz von HRP dargestellt.

4.5 Aliskiren

Im September 2007 ist mit Aliskiren der erste peroral bioverfügbare Renininhibitor in Deutschland auf den Markt gekommen. Auch Aliskiren unterdrückt die negative Feedback-Schleife und führt zu einem kompensatorischen Anstieg der Plasma-Reninkonzentration. Die negative Feedback-Schleife würde bei normaler Angiotensin II-Wirkung eine weitere Reninfreisetzung verhindern. Da die Angiotensin II-Wirkung aber durch Aliskiren gehemmt wird, kann Renin weiter gebildet werden. Die Folge ist ein kompensatorischer Anstieg der Reninkonzentration. Dieser kompensatorische Anstieg der Reninkonzentration tritt bei Einnahme von allen Medikamenten auf, die die Angiotensin II-Wirkung hemmen (ACE-Hemmer, AT1R-Blocker und Renininhibitoren).

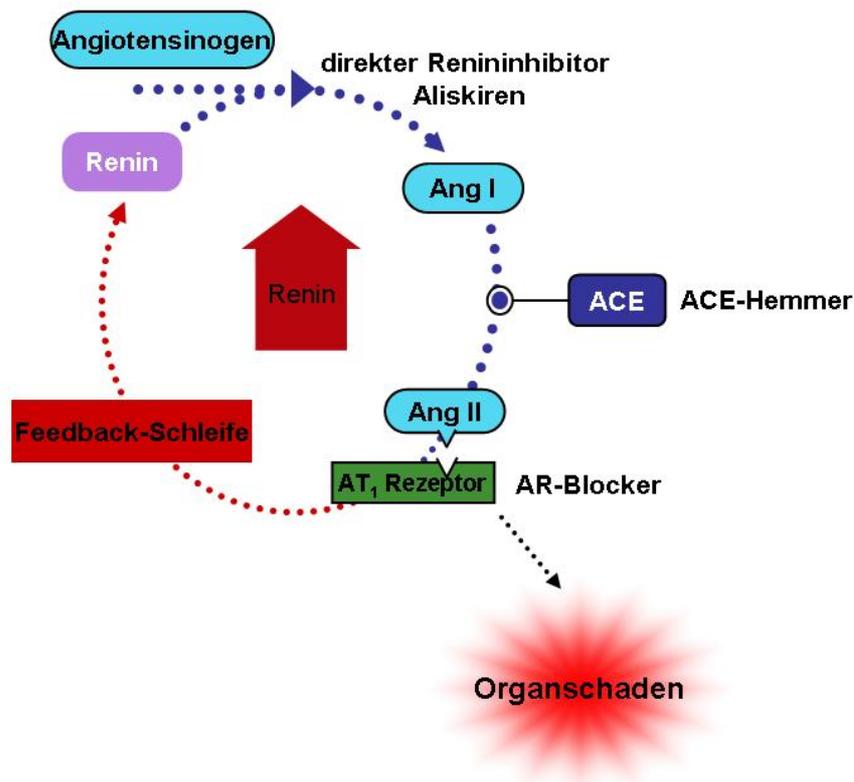


Abbildung 6: RAS-blockierende Substanzen

Bei der Einnahme von ACE-Hemmern, AT1R-Blockern und Reninhibitoren wird die Bildung bzw. Wirkung von Angiotensin II verhindert. Es kommt zur Unterbrechung der negativen Feedbackschleife, die die weitere Bildung von Renin verhindern würde. Daher sind die Plasmenreninkonzentrationen nach Einnahme dieser Medikamente hoch.

Aliskiren leitet sich aus AOPEN-Bruchstücken ab und blockiert durch die Bindung im katalytischen Zentrum von Renin die Umwandlung von AOPEN zu Angiotensin I, wodurch in Folge auch die Konzentration des vasokonstriktorisch wirksamen Angiotensin II herabgesetzt wird. Anders als andere RAS-Inhibitoren, wie ACE-Inhibitoren oder AT1R-

Blockern, setzt Aliskiren somit bei noch erhöhter Reninkonzentration die Reninaktivität und damit die Aktivität des RAS herab. Aliskiren führt in Mono- und Kombinationstherapie zu einer ausgesprochen guten Blutdrucksenkung [40, 41]. In unserer Arbeitsgruppe ist in einem doppelt-transgenen Rattenmodell (dTGR) gezeigt worden, dass Aliskiren zur Abschwächung des renalen und kardialen Organschadens beiträgt [42, 43].

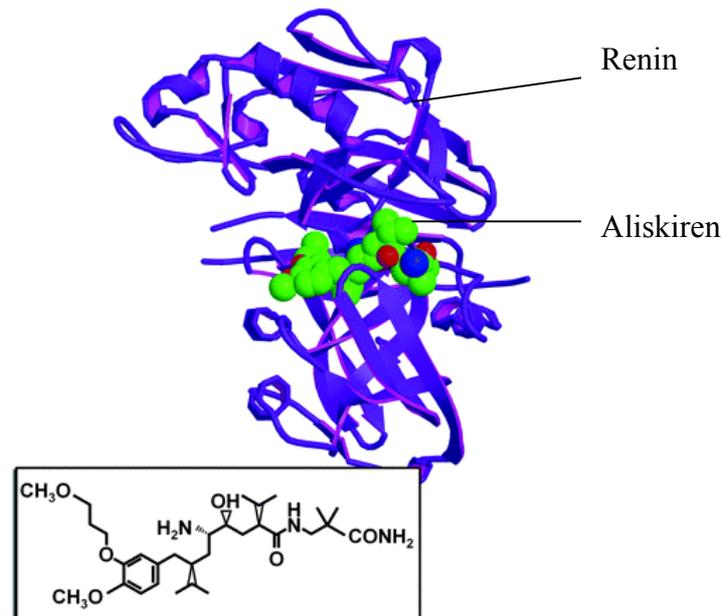


Abbildung 7: Aliskiren

Blockade des aktiven Zentrums von Renin durch Bindung von Aliskiren; Strukturformel von Aliskiren

4.6 Tiermodelle

Die Speziespezifität von Renin ist so, dass humane Renininhibitoren praktisch nur in Affen und Meerschweinchen getestet werden können. Beide Modelle sind nicht ideal für Hypertoniestudien.

Um das Problem zu lösen, entwickelten Ganten, Mullins, Murakami, und andere [44] die doppelt-transgenen Ratten (dTGR(hRen*hAOGEN)). Die doppelt-transgenen Ratten tragen beide humane Transgene, also humanes AOGEN (hAOGEN)-Gen und humanes Renin (hRen)-Gen zusätzlich zu den jeweiligen Ratten-Genen, und damit alle notwendigen Komponenten des humanen RAS. Das humane AOGEN-Konstrukt besteht aus dem gesamten humanen AOGEN-Gen (5 Exons und 4 Introns), flankiert von 1,3 kB am 5'Ende und 2,4 kB am 3'Ende; das humane Reninkonstrukt aus dem gesamten genomischen Bereich des humanen Renin-Gens (10 Exons und 9 Introns) mit 3,0 kB der 5'Region des Promoters und zusätzlichen 1,2 kB der 3'Sequenz [45]. Die Tiere gehen aus der Kreuzung der homozygoten humanen AOGEN-Linie und der homozygoten humanen Renin-Linie hervor (Abbildung 8). Ratten, die nur einzeln transgen für humanes AOGEN oder humanes Renin sind, sind

normoton. Humanes Renin spaltet nur humanes AOPEN, während Ratten-AOPEN nur als Substrat für Ratten-Renin dient. Das aus den beiden Systemen entstehende Angiotensin I ist identisch und wird auf gleiche Weise zu Angiotensin II umgewandelt [46]. Unbehandelte dTGR entwickeln Bluthochdruck, Niereninsuffizienz mit einer ausgeprägten Albuminurie, Vaskulopathie und schwere linksventrikuläre Hypertrophie mit fokalen Nekrosearealen. Sie sterben bereits im Alter von 7 bis 8 Wochen [47, 48]. Aufgrund des Schweregrades der Nieren-, Herz- und Gefäßschädigung eignet sich das Modell in besonderer Weise zur Untersuchung der Pathogenese und der Angiotensin II-bedingten Organschäden und für die Untersuchung der Wirksamkeit von Inhibitoren, insbesondere auch von Renininhibitoren [49].

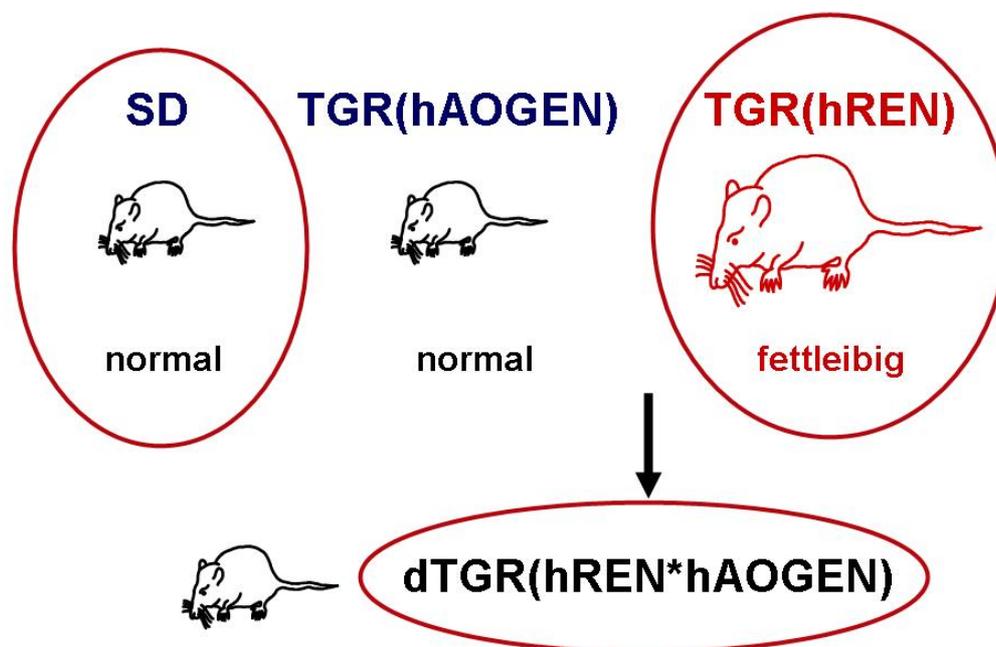


Abbildung 8: Generierung der doppelt-transgenen Ratten (dTGR)

Doppelt-transgene Ratten entstehen durch Kreuzung der jeweils nicht hypertensiven TGR(hRen) und TGR(hAOPEN). Die dTGR exprimieren humanes Renin-Gen und humanes AOPEN-Gen zusätzlich zu den jeweiligen Rattengen. Die dTGR bilden viel Angiotensin II, entwickeln hohen Blutdruck und Organschaden. Sprague Dawley (SD)-Ratten sind nichttransgene gesunde Ratten, die in den Experimenten als Kontrollen dienen. Eine besondere Eigenschaft der TGR(hRen) ist ihr erhöhtes Körpergewicht.

Es sind bereits zwei Studien mit Aliskiren und den doppelt-transgenen Ratten in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt worden. In der ersten Studie werden dTGR von der 6. bis zur 9. Lebenswoche mit Valsartan, Aliskiren oder Plazebo behandelt und die Wirksamkeit der Behandlungen verglichen. Als Kontrollen dienen nichttransgene gesunde SD-Ratten. Ergebnis dieser Studie ist, dass äquieffektive Dosen von Valsartan oder Aliskiren den Organschaden in

dTGR stark abschwächen [50]. In einer zweiten Studie hat unsere Arbeitsgruppe Komplementexpression und C-reaktive Protein (CRP)-Bildung im dTGR-Modell untersucht. Wir haben gefunden, dass CRP-Bildung, Makrophagen- und T-Zellen-Migration, TNF α -, C1q-, C3-, C3c- und C5b-9-Expression zum Fortschreiten der Albuminurie in unbehandelten dTGR beitragen. Somit spielt die Komplement-Aktivierung eine wichtige Rolle im Angiotensin-II-vermittelten Schaden im dTGR-Modell. Man kann weiter ableiten, dass TNF α und CRP eine Rolle in der Induktion des Komplementsystems spielen. In dieser Studie haben Aliskiren und Losartan TNF α -, CRP- und C1q, C3, C3c und C5b-9-Expression auf Kontrollniveau reduziert [43].

TRG(hRen) sind nicht hyperten, scheinen völlig gesund und sind insgesamt noch nicht so gut charakterisiert wie die dTGR. Ab der 8.-9. Lebenswoche zeigen diese TGR(hRen) allerdings ein signifikant höheres Körpergewicht im Vergleich zu SD-Ratten. Aufgrund der Spezies-Spezifität von Renin wird durch das Fehlen von humanem AOPEN-Gen RAS nicht verstärkt aktiviert. Daher lassen sich mit diesem Modell Reninwirkungen untersuchen, die unabhängig von der Aktivierung des RAS sind. Bisher haben wir beobachtet, dass die TGR(hRen) mehr Nahrung als SD-Ratten aufnehmen bei freiem Zugang zum Futter. Sie haben also erhöhten Appetit. Das Hormon Leptin ist ein natürlicher Appetitzügler. Leptin wird durch das „obese“-Gen kodiert und von den Fettzellen abgegeben. Leptin hemmt das Auftreten von Hungergefühlen und spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Fettstoffwechsels von Menschen und anderen Säugetieren. Leptin wird in die Blutbahn in einer Menge proportional zur Fettmasse sezerniert und überwindet die Blut-Hirn-Schranke mittels eines Transportmechanismus. Rezeptoren für Leptin (Ob-Rs) konnten in zwei unterschiedlichen Populationen von Neuronen in Kerngebieten des Nucleus arcuatus und Nucleus paraventricularis des Hypothalamus identifiziert werden. Die erste Gruppe dieser Neuronen produziert die appetitstimulierenden Neuropeptide AgRP (agouti-related protein) und NPY (Neuropeptid Y), welche durch das Leptin unterdrückt werden. Die zweite Population produziert POMC (Proopiomelanocortin) und CART (Cocaine- und Amphetamine-regulated transcript), beides Transmitter, die appetitzügelnd wirken. Diese werden durch Leptin aktiviert. Nimmt die Fettzellmasse bei erhöhter Nahrungszufuhr zu, wird die Leptinsekretion aus dem Fettgewebe erhöht, wodurch die NPY-Sekretion sinkt und die α -MSH-Sekretion steigt. Insgesamt wird dadurch der Appetit gebremst, die Nahrungszufuhr vermindert und damit eine weitere Zunahme der Fettmasse und des Gewichts verhindert. Es ergibt sich ein geschlossener Regelkreis. Häufig haben aber fettleibige Menschen keinen Mangel an Leptin, sondern weisen hohe Spiegel dieses Hormons auf. Diese häufig hungrigen Patienten leiden an

einer sogenannten Leptinresistenz. In diesem Zustand unterbleibt die physiologische Wirkung des Leptins auf die Zielneuronen. Die Regulation des Leptingens im Fettgewebe und die Leptinkonzentrationen im Blut der TGR-Ratten im Vergleich zu SD-Ratten sind noch nicht untersucht worden.

4.7 Fragestellungen

Diese Arbeit hat die Untersuchung drei verschiedener Themenkomplexe zum Ziel.

Wie in der Einleitung bereits geschildert, kann Renin eine ERK-Phosphorylierung über den (P)RR induzieren. Über den entsprechenden Signaltransduktionsweg ist erst wenig bekannt.

Erstes Hauptziel dieser Arbeit ist es, die (Pro)renin-(P)RR-Signaltransduktion zu untersuchen.

Der neue Renininhibitor Aliskiren hemmt die Reninaktivität und bewirkt eine starke Senkung der Aktivität des RAS. Bisher ist nicht bekannt, ob Aliskiren auch (P)RR-blockierende Eigenschaften besitzt. HRP soll die erste Substanz mit (P)RR-blockierenden Eigenschaften sein und hat den Organschaden in verschiedenen Tiermodellen verbessert.

Zweites Hauptziel dieser Arbeit ist es, die Wirkungen von Aliskiren und HRP in vitro und in vivo zu vergleichen.

Die Regulation des (P)RR auf mRNA-Niveau ist in vitro zum Teil bekannt und in vivo weitgehend unbekannt. **Drittes Hauptziel** dieser Arbeit ist die Untersuchung der (P)RR-mRNA-Expression in Tiermodellen mit unterschiedlich aktiviertem RAS und in diesen jeweils in verschiedenen Organen. Es gilt, herauszufinden, ob es einen allgemeingültigen Mechanismus der Regulation gibt oder ob die Regulation des (P)RR vom Organ und/oder von der (Pro)reninkonzentration abhängig ist.

1. (Pro)renin - (P)RR-Signaltransduktion

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- Wird der (P)RR in U937-Zellen und CASMC exprimiert?
- Hat die Stimulation mit Renin oder Prorenin einen Einfluss auf die (P)RR-Expression in CASMC und U937-Zellen?
- Wo ist der (P)RR in U937-Zellen lokalisiert?
- Kann neben Renin auch Prorenin zu einer Aktivierung der MAP-Kinase ERK in CASMC und U937-Zellen führen?
- Ist die durch Renin- oder Prorenin-induzierte Signaltransduktion unabhängig von Angiotensin II? Dazu werden die Zellen mit AT1R-Blocker (Losartan) und AT2R-Blocker (PD123319) vorinkubiert. Weiter wird die Signaltransduktion in AT1a-Rezeptor-defizienten Zellen untersucht.
- Wird die Renin- oder Prorenin-vermittelte ERK-Phosphorylierung über EGF-Rezeptor in U937-Zellen vermittelt?

- Spielt die PKC α/β eine Rolle in der (P)RR-Signaltransduktion?
- Kann ein MEK-Inhibitor die Aktivierung der MAP-Kinase ERK verhindern?
- Vermittelt auch deglykosyliertes Renin eine ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen?

2. Vergleich der Wirkungen von Aliskiren und HRP in vitro und in vivo

Beim Vergleich der Wirkungen von Aliskiren und HRP in vitro sollen folgende Fragen durch Experimente in U937-Zellen und CASMC beantwortet werden.

- Ist der Renininhibitor Aliskiren auch ein (P)RR-Blocker und hemmt die (Pro)renin-induzierte ERK-Aktivierung über den (P)RR?
- Hemmt der (P)RR-Blocker HRP die (Pro)reninsignaltransduktion?

Um die Wirkungen von Aliskiren und HRP auch in vivo zu vergleichen, werden dTGR mit Aliskiren, HRP oder Plazebo behandelt. Als Kontrollen dienen nichttransgene SD-Ratten.

Folgende Fragestellungen sollen im dTGR-Modell untersucht werden:

- Welchen Einfluß haben beide Substanzen auf Sterblichkeit und Blutdruck im dTGR-Modell
- Können Aliskiren und HRP den Nierenschaden in dTGR verbessern?

3. Untersuchung verschiedener Tiermodelle mit unterschiedlich aktiviertem RAS

Es werden Alters- und Gewebe-spezifische mRNA-Expressionsuntersuchungen verschiedener Gene durchgeführt. Untersucht werden Herzen, Leber, Nieren, Glomeruli und die tubulointerstitielle Fraktion und Gefäße von jeweils 7 Wochen alten TGR(hRen), dTGR und SD-Ratten und Herzen und Fettgewebe von jeweils 21 Wochen alten TGR(hRen) und SD-Ratten.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

- Wie ist (P)RR in den verschiedenen Organen der jeweiligen Modelle und zu unterschiedlichen Alterszeitpunkten auf mRNA-Ebene reguliert?
- Wie sind Ratten-TGFbeta1- und PI3Kp85lapha-mRNA im Verhältnis zur jeweiligen Ratten-(P)RR-Expression reguliert?

5 Material

5.1 Gewebeisolierung

Stahlsiebe (160 µm, 125 µm und 71 µm Maschenweite) neoLab

5.2 RNA-Isolierung

Trizol[®] Reagenz Invitrogen

Chloroform Merck

Ethanol 96 % Roth

Quiagen RNeasy Mini Kit Quiagen

RNase-Free DNase Set Quiagen

5.3 Bestimmung der RNA-Qualität

RNA 6000 Nano Assay Agilent Technologies

Chip Priming Station Agilent Technologies

RNaseZAP Ambion

5.4 Bestimmung der RNA-Quantität

NanoDrop[®] ND1000 peqlab

5.5 cDNA-Synthese

Random Primer Invitrogen

SuperScript[™] III Reverse Transcriptase Invitrogen

dNTP Promega

5.6 Real time quantitative PCR

5.6.1 Geräte

Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System Applied Biosystems

5.6.2 Software

Primer Express[®] ABI PRISM Applied Biosystems

7500 Fast System Software Applied Biosystems

SPSS Version 12.0 (statistical program for social sciences)

5.6.3 Materialien und Reagenzien

Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems
TaqMan [®] Fast Universal PCR Master Mix (2×), No Amp Erase [®] UNG	Applied Biosystems
AmpErase [®] (Uracil-N-glycosylase, 1 U/μl)	Applied Biosystems
Nuklease freies Wasser	Fluka
Syber Mastermix	Eurogentech
Primer- und Sondensets	BioTez
Human GAPDH (20 ×) Pre-Developed TaqMan [®] Assay Reagents	Applied Biosystem
RNase Away	Fisher Scientific

5.6.4 Sequenzen der Primer und Sonden

Spezies	Primer und Sonden	Sequenz in 5'-3'-Richtung
Mensch	h (P)RR-126 forward	CCCAGACGTGGCTGCATT
	h (P)RR-191 reverse	GCGAGTCCTGGCCAAGAA
	h (P)RR-145 Sonde	TCCATGGGCTTCTCTGTGAAAGAAGACC
	h Renin-102 forward	CAGGGACAGTCAGTGGCTTTC
	h Renin-170 reverse	ACATCTGTGTCACCGTGATTCC
	h Renin-125 Sonde	AGCCAGGACATCATCACCGTGGG
Ratte	Ratten-(P)RR-35 forward	CCCCACAGGCAGCGTC
	Ratten-(P)RR-106 reverse	GAATTGGCCCACTGTCAAGAC
	Ratten-(P)RR-53 Sonde	CTCTTACCCTTTGGAGAATGCAGTTCCTTT
	Ratten-Renin-166 forward	CACGGGTTTCAGCCAACCT
	Ratten-Renin-236 reverse	TGTGAATCTCACAGGCAGTGTAGA
	Ratten-Renin-185 Sonde	TGGGTGCCCTCCACCAAGTGTG
	Ratten-Ngal-142 forward	CAGGGCAGGTGGTTCGTT
	Ratten-Ngal-215 reverse	AGCGGCTTTGTCTTTCTTTCTG
	Ratten-PI3Kp85alpha-15 fw.	CATTAAGCCGGACCTCATTCA
	Ratten-PI3Kp85alpha-92 rev.	TGCCGGACCCCTTTCTG
	Ratten-TGFbeta1-forward	GCCTGAGTGGCTGTCTTTTGA
	Ratten-TGFbeta1-reverse	CCTGTATTCCGTCTCCTTGGTT
Ratten-TGFbeta1-Sonde	CACTGGAGTTGTCCGGCAGTGGC	
Ratten-Leptin-133 forward	ATTTCACACACGCAGTCGGTAT	
Ratten-Leptin-195 reverse	CCCGGGAATGAAGTCCAAA	
Ratten-Leptin-156 Sonde	CGCCAGGCAGAGGGTCACCG	
Ratten-GAPDH forward	GAACGGGAAGCTCACTGGC	
Ratten-GAPDH reverse	GCATGTCAGATCCACAACGG	
Ratten-GAPDH Sonde	AGCTGGTCATCAACGGGAAACCCA	
Ratte/Mensch	18 S-461 forward	ACATCCAAGGAAGGCAGCAG
	18 S-525 reverse	TTTTCGTCACTACCTCCCCG
	18 S-483 Sonde	CGCGCAAATTACCCACTCCCGAC

Die Sonden sind am 5'-Ende FAM- und am 3'-Ende TAMRA-markiert.

5.7 Zellkultur

5.7.1 Zusätze für die Zellkultur

RPMI-Medium	PAA
SmBM-Medium	Lonza
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco
FCS	Biochrom
PBS	PAA
DMSO	Sigma
Trypsin / EDTA	Gibco
hEGF	Biochrom
hFGF	Biochrom
Insulin	Sigma

5.7.2 Stimulantien

Rekombinantes humanes Prorenin

Das humane rekombinante Prorenin wird in CHO (Chinese hamster ovary)-Zellen produziert. Die Zellen werden mit einem Vektor mit humaner Prorenin-cDNA transfiziert. Die Aufreinigung erfolgt durch Cibacron Blue Sepharose Affinitätschromatographie. Die intrinsische Reninaktivität in der Proreninaufreinigung aufgrund proteolytischer Aktivität liegt unter 2 % der Aktivität nach vollständiger proteolytischer Aktivierung. Prorenin wird bei -70 ° C gelagert.

Rekombinantes humanes Renin

Renin wird durch die proteolytische Aktivierung von humanem rekombinantes Prorenin durch immobilisiertes Trypsin hergestellt. Sepharose gebundenes Trypsin (0,25 mg Trypsin / ml) wird zur Proreninpräparation hinzugegeben und für 72 Stunden bei 4 ° C inkubiert. Das Trypsin wird durch Zentrifugation entfernt. Aufgereinigtes Renin enthält kein Prorenin mehr. Die Lagerung Renins erfolgt bei -70°C.

5.7.3 Inhibitoren

Losartan (AT ₁ -Rezeptor-Blocker)	Sigma
PD123319 (AT ₂ -Rezeptor-Blocker)	Sigma
PD98059 (MEK-Inhibitor)	Calbiochem
Gö6956 (PKC _{α/β} -Inhibitor)	Calbiochem
Aliskiren (Renininhibitor)	Novartis
HRP ((P)RR-Inhibitor) (human)	Biosynthan
(NH ₂ -RIFLKRMPHSI-COOH)	

5.7.4 Zellkulturmedien

Medium für U937-Zellen

RPMI-Medium
1 % FCS
0,1 % Pen/Strep

Mangelmedium für U937-Zellen

RPMI-Medium
0,1 % Pen/Strep

Medium für CASMC

SmBM-Medium
0,5 % FCS
0,1 % Pen/Strep
5 µg/ml Insulin
0,5 ng/ml hEGF
2 ng/ml hFGF

Mangelmedium für CASMC

SmBM-Medium
0,1 % Pen/Strep

Das CASMC-Medium und das CASMC-Mangelmedium werden auch für die AT1aR-ko-VSMC genutzt.

Einfriermedium

80 % FCS
20 % DMSO

5.8 Western Blot

5.8.1 Puffer und Lösungen

1,5 M Tris pH 8,8

27,23 g Trisbase (27,23 g/100 ml)

80 ml destilliertes Wasser

Der pH-Wert wird auf 8,8 mit 1N HCL eingestellt.

Diese Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 150 ml aufgefüllt und bei 4 ° C im Kühlschrank aufbewahrt.

1 M Tris pH 6,8

18,15 g Trisbase (18,15 g/100 ml)

80 ml destilliertes Wasser

Der pH-Wert wird auf 6,8 mit 1N HCL eingestellt.

Diese Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 150 ml aufgefüllt und bei 4 ° C im Kühlschrank aufbewahrt.

6×Probenpuffer (Laemmli Probenpuffer)

3,5 ml 1 M Tris pH 6,8

1 g SDS 10 %

3,6 ml Glycerol

500 µl β Mercaptoethanol

1,2 ml 0,1 % Bromphenolblau bzw. 0,5 ml 0,25 % Lösung

ad 10 ml H₂O

10×Laufpuffer ohne SDS

0,25 M Tris

1,92 M Glycin

1×Laufpuffer 1 l

100 ml 10×Laufpuffer

900 ml dH₂O

10 ml 10 % SDS

Blot-Puffer 1 l

200 ml Methanol

100 ml 10×Laufpuffer

700 ml dH₂O

10×TBS

150 mM NaCl
20 mM Tris-HCl
pH-Wert 7,5

1×TBS-T 1 l

100 ml 10×TBS
900 ml dH₂O
1 ml Tween 20

Blockpuffer

1×TBS-T
1 % Pepton

ECL-Western Blot Detection Kit

Pierce Bioscience

Pro Blot

1 ml Lösung A
1 ml Lösung B
immer frisch ansetzen

Proteinmarker

„Kaleidoscope Prestained Standards“

Bio Rad

5.8.2 Antikörper

pERK

Cell Signaling

(phospho-p44/42 MAP-Kinase)

eIF4E-Antibody

Cell Signaling

ERK

Cell Signaling

(p44/42 MAP-Kinase)

5.8.3 Material

Extra Thick Blot Paper Mini Blot Size

BioRad

Nitrocellulose

Schleicher & Schüll

Filme

Pierce Bioscience

5.8.4 Geräte

Elektrophoresekammern	BioRad
Gelgießstände	BioRad
Blotapparatur	BioRad
Entwicklermaschine	AGFA
Imager Chemicapt 5000	Peqlab

5.8.5 Software

Chemicapt 5000	peqlab
SPSS Version 12.0 (statistical program for social sciences)	

5.9 Kinase-Assay

P44/42 MAP Kinase Assay Kit	Cell Signaling
-----------------------------	----------------

5.10 Durchflusszytometrie (FACS[®], Fluorescence Activated Cell Sorting)

5.10.1 Lösungen

PBS + 3 % FCS + 0,1 % Na-Acid	
PBS + 1 % Formaldehyd	
Fix and Perm Cell Permeabilization kit	An-der-Grub

5.10.2 Zellen

embryonale Stammzellen (ES-Zellen) RST307	BayGenomics
---	-------------

5.10.3 Markierungsreagenzien

h(P)RR-Antikörper aus Kaninchen (1623)	G. Nguyen
entsprechendes Präimmunserum (Isotypkontrolle) (1624)	G. Nguyen
sekundärer Antikörper (FITC-markierter Esel- α -Kaninchen-Antikörper)	G. Nguyen
FITC-HRP (human) (FITC-Ahx-RIFLKRMP5I-COOH)	Biochem

5.10.4 Gerät

BD FACScan Flow Cytometer Becton Dickinson

5.10.5 Software

CellQuestPro-Software Becton Dickinson

5.11 Immunozytochemie

5.11.1 Mikroskop

Axioplan 2 mit SensiCam (40fache Vergrößerung) Zeiss

5.11.2 Software

AxioVision 3.0. Zeiss

5.11.3 Antikörper

Gab hu Collagen Typ I Southern Biotech
D anti Goat-Cy3 JacksonImmunoResearch

5.11.4 Material

10 % Eseserum JacksonImmunoResearch
VectaShield Mounting Medium with DAPI Vektor
Aceton Roth

5.12 Tierexperimente

Elisa für Albuminmessung im Urin CellTrend
Humanes HRP Biosynthan
(NH₂-RIFLKRMP₅I-COOH)
Ratten-HRP Biosynthan
(NH₂-RILLKKMPSV-COOH)

6 Methoden

6.1 Gewebeisolierung

6.1.1 Homogenisierung von Rattengeweben

Ein repräsentativer Anteil des jeweilig tiefgefrorenen Organs (-80 ° C) wird unter flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert, die Gewebesuspension in Falcons überführt, der Stickstoff auf Trockeneis abgedampft und die Probe tiefgefroren (-80 ° C). In dieser Arbeit werden Rattenherzen, Rattenleber und Rattennieren auf diese Weise homogenisiert.

6.1.2 Isolierung von Glomeruli und Tubuli aus Rattennieren

Die Ratten werden durch Etherinhalation anästhesiert und mit der Guillotine getötet. Die Nieren werden entnommen und als erstes die Kapsel entfernt. Dann wird die Niere halbiert und auf drei graduierte, ineinander stapelbare Metallsiebe mit absteigender Maschengröße von 160 µm, 125 µm und 71 µm gebracht, um Glomeruli und die tubulointerstitielle Fraktion und Gefäße zu isolieren. Auf dem obersten Sieb haben wir die Gewebemasse mit einem Pistill verteilt und durch die Maschen gedrückt und anschließend mit im Kühlschrank gekühlter, isotonischer Kochsalzlösung gespült, bis sich auf dem obersten Sieb nur noch wenig bräunliches kortikales Gewebe befindet. Die auf dem zweiten Sieb befindlichen tubulointerstitielle Fraktion und Gefäße werden mit der kalten Kochsalzlösung in der Spritzflasche zusammengetrieben und in Falcons überführt. Auf dem letzten Sieb liegen die Glomeruli, welche ebenfalls mit der kalten Kochsalzlösung in der Spritzflasche zusammengetrieben und in Falcons überführt werden. Die so isolierten und gereinigten tubulointerstitiellen Fraktionen mit Gefäßen und Glomeruli werden dann für 15 Minuten bei 15.000 U/Minute und 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die isolierten Gewebe sofort bei – 80°C weggefroren.

6.2 Stimulationen von U937-Zellen und CASC für RNA-Isolierungen

2-3 Stunden vor der Stimulation erhalten die Zellen neues Vollmedium. Die Zellen werden mit Losartan und PD123319 sowie mit dem jeweiligen Inhibitor für 30 Minuten vorinkubiert. Nach Behandlung der Zellen mit Renin oder Prorenin inkubieren diese für weitere 24 Stunden im Brutschrank. Die Ernte der Zellen erfolgt am nächsten Tag.

Bei der Ernte der adhärennten CASMC wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann dient 1 ml PBS zum Ablösen der Zellen mit dem Zellschaber. Diese Mischung kann dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Der Vorgang wird noch einmal wiederholt und die Zellsuspension in dasselbe Gefäß pipettiert. Danach werden die Zellen zentrifugiert und der Überstand weggefroren. Die Zellen werden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C weggefroren oder weiterverarbeitet. Die Suspensionszellen (U937-Zellen) werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Medium kann anschließend vorsichtig abgesaugt werden. Die Zellpellets werden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt oder direkt genutzt für die RNA-Isolierung.

6.3 RNA-Isolierung

Für Genexpressionsanalysen haben wir RNA aus Rattengewebe (Herz, Leber, Niere, Glomeruli und tubulointerstitielle Fraktion mit Gefäßen) und aus humanen Zellen (CASMC, U937-Zellen) isoliert.

Das Grundprinzip der RNA-Isolierung sieht folgendermaßen aus:

Zellen oder Gewebe werden lysiert, RNAsen inaktiviert und RNA aus dem Gemisch isoliert.

Auf diese Weise erhält man am Ende Gesamt-RNA, d. h. ein Gemisch aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA) und Anderen. Die mRNA macht daran nur einen Anteil von 2 % aus. Für die meisten Anwendungen reicht das bereits aus, so auch für die RT-PCR, zu dessen Verwendung sie anschließend dienen soll.

Bei der Einschrittmethode der RNA-Isolierung wird das Ausgangsmaterial mit Guanidinisothiocyanat (GTC) lysiert – GTC ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine denaturiert und inaktiviert und sogar RNAsen inhibiert. Durch Zugabe des sauren Phenols gehen die Proteine in die Phenolphase über. Im sauren Phenol lösen sich sogar kleinere DNA-Fragmente, die Größeren sammeln sich nach der Zentrifugation an der Interphase. Im wässrigen Überstand bleibt die RNA zurück, die man anschließend nur noch auszufällen braucht. Bei dieser Methode findet die Inaktivierung der RNAsen sofort nach der Lyse statt.

Vor Durchführung der TaqMan-Experimente in dieser Arbeit haben wir eine Validierung der RNA-Isolierungsmethode vorgenommen. Dabei haben wir herausgefunden, dass eine Lyse der Gewebe- und Zellproben mit Trizol-Reagenz, Fällung der RNA, anschließender DNA-Verdau und Reinigung der Probe auf einer Quiagen-Säule zu niedrigen RNA-Ausbeuten und nicht ausreichend guten Qualitätswerten (A260/A230 und A260/A280-Werte) führen. Bei

Anwendung der Quiagen-RNA-Isolierungsmethode haben wir Proben erhalten, die sehr gute Qualitätswerte aufweisen. Die Ausbeuten sind aber wegen der geringeren Effektivität des bei der Quiagen-Methode verwendeten Lysepuffers teilweise gering. Um die Vorteile beider Methoden zu nutzen, haben wir beide Methoden kombiniert. Zur RNA-Isolierung in dieser Arbeit sind wir folgendermaßen vorgegangen:

Wir verwenden für die Lyse unseres Ausgangsmaterials Trizol[®]-Reagenz. Trizol ist ein Fertigreagenz für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben. Es ist eine monophasische Lösung aus Phenol und GTC. Während der Probenhomogenisierung und –lyse bewahrt Trizol die Integrität der RNA, während es Zellen zerstört und Zellkomponenten löst. Wir lysieren unsere Proben mit 1 ml Trizol pro Gewebe- oder Zellprobe (entspr. 50-100 mg Gewebe; pro Kulturschale mit 10 cm Durchmesser für adhärierende Zellen; pro 10⁶ Zellen für Suspensionszellen), homogenisieren durch Auf- und Niederpipettieren und inkubieren für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT). Dann werden 200 µl Chloroform zugesetzt, geschüttelt, 5 Minuten bei RT inkubiert und für 15 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Dadurch teilt sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. RNA bleibt ausschließlich in der wässrigen Phase, DNA-Fragmente sammeln sich hauptsächlich an der Interphase und Proteine in der Phenolphase. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es werden ungefähr 500 µl wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die gleiche Menge RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol (10 µl β-Mercaptoethanol auf 1 ml RLT-Puffer) hinzugefügt. RLT-Puffer ist der Lysepuffer aus dem Quiagen RNeasy Mini Kit. In diesem Kit erlaubt das Hochsalzpuffersystem die Bindung von Gesamt-RNA an eine Silica-Gel-Membran. Die Zugabe des RLT-Lysepuffers mit β-Mercaptoethanol an dieser Stelle dient nur zur Anpassung der Probe an die Säulenbedingungen. Jetzt liegt ein Volumen von 1000 µl im jeweiligen Reaktionsgefäß vor. Das gleiche Volumen Ethanol 70 % wird dazupipettiert. Jeweils 700 µl dieses Ansatzes werden auf die Quiagen-Säule geladen. Nach jeder Ladung wird für 1 Minute bei RT und 1000 rpm zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Wenn das gesamte Volumen auf die Säule geladen ist, wird zum ersten Mal mit reduziertem Volumen 350 µl RW1-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Danach muß ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt werden. Dazu benutzt man RNase-Free DNase Set von Quiagen. Pro Probe werden 10 µl DNase I Stocklösung zu 70 µl RDD-Puffer pipettiert und anschließend 80 µl auf die RNeasy Silika-Gel-Membran pipettiert. Dieses Gemisch soll 30 Minuten bei RT auf der Säule einwirken. Danach wird die RNeasyMini-Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen. Als Nächstes werden die Säulen noch zweimal mit jeweils 500 µl

RPE-Puffer gewaschen. Nach diesen beiden Waschschriften zentrifugieren wir die Säule bei maximaler Geschwindigkeit für 2 Minuten trocken. Zum Schluß wird die RNA mit 30 – 50 µl RNase freiem Wasser in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert und die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop®ND1000 gemessen. Mit dieser kombinierten Methode erhalten wir RNA mit hoher Quantität und Qualität (bessere A260/A230 und A260/A280-Werte).

6.4 RNA-Quantifizierung mittels Nanodropmessung

Der NanoDrop®ND1000 ist ein Gesamt-Spektrum-Spektrophotometer (221-750 nm), welches nur 1 µl Volumen der jeweiligen Probe benötigt, um mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu messen. Genutzt wird die patentierte Probenretentionstechnologie, mittels welcher die entsprechende Probe nur durch die Oberflächenspannung am Messort gehalten wird. Dadurch benötigt man keine Küvetten und die Reinigung des Gerätes ist in wenigen Sekunden möglich. Ein weiterer Vorteil des Nanodrops gegenüber einem UV/VIS-Spektrometer besteht darin, dass hochkonzentrierte Proben ohne vorherige Verdünnung (50 mal höher konzentriert als für Proben, die in einem Standardküvettenpektrometer gemessen werden) gemessen werden können und damit eine entsprechende Fehlerquelle ausgeschaltet wird. Eine Xenonlampe stellt die entsprechende Lichtquelle dar und ein Spektrometer, welches eine CCD-Kamera nutzt, wird verwendet, um das Licht, das die Probe passiert hat, zu analysieren. Eine Probe wird auf das Ende des einen Glasfaserkabels pipettiert. Ein zweites Glasfaserkabel wird dann mit der Flüssigkeitsprobe in Kontakt gebracht, was bewirkt, dass die Flüssigkeit die Lücke zu den beiden Faserkabeln überbrückt. Für die hier genutzten RNA-Messungen werden 1,5 µl der jeweiligen Probe verwendet, um sicherzustellen, dass die Flüssigkeitssäule gebildet und der Lichtweg durch die Probe komplett belegt wird. Zu Beginn wird mit 1,5 µl Wasser der Blankwert gemessen. Nach jeder Messung säubert man das obere und untere Pedal des NanoDrops mit einem weichen Tuch.

Auch die Qualitätswerte 260/280 und 260/230 werden mit dem Nanodrop für jede Probe gemessen und mittels der entsprechenden Software auf dem Computer angezeigt. Sie geben Auskunft über Verunreinigungen der Proben mit Lösungsmitteln, Proteinen und Salzen, die die Enzyme in der nachfolgenden cDNA-Synthese und Real Time-PCR hemmen könnten.

Bei der Nanodropmessung wird die Absorption der jeweiligen Probe bei 260 nm gemessen.

Die RNA-Konzentration errechnet sich wie folgt:

$$C (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times F$$

OD₂₆₀ Absorption bei 260 nm

F Multiplikationsfaktor (40 für RNA)

Es werden nur RNA-Proben für nachfolgende Untersuchungen verwendet, die folgende

Qualitätswerte erfüllen: $A_{260}/A_{280} \square 1,9$

$A_{260}/A_{230} \square 1,8$

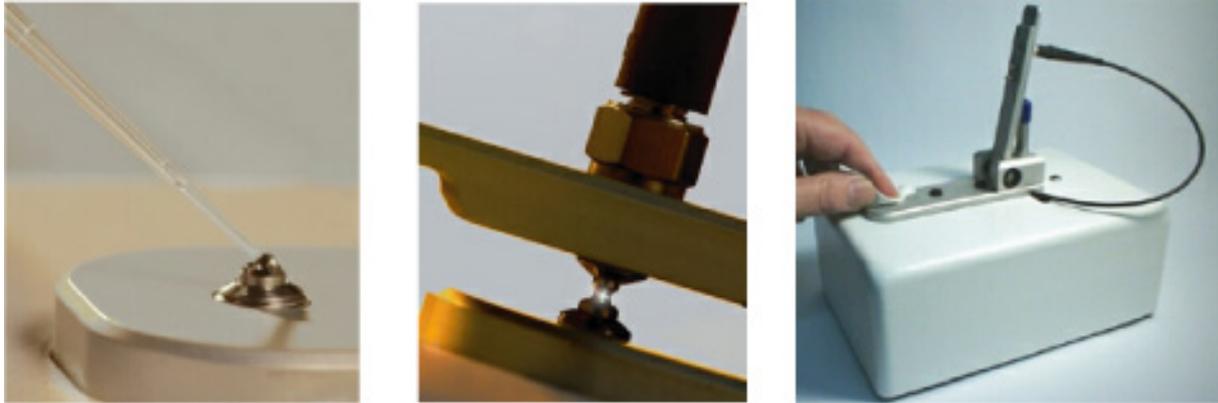


Abbildung 9: Durchführung der RNA-Messung am Nanodroppergerät

links: Auftragung der Probe, **Mitte:** Messung der Probe, **rechts:** Reinigung des Nanodroppergerätes

6.5 RNA-Qualitätsprüfung mittels Bioanalyserchip

Alle Reagenzien werden bei 4 ° C gelagert und 30 Minuten vor Gebrauch auf RT gebracht.

Zunächst sollen 550 μl Gel auf den Spin Filter pipettiert, für 10 Minuten bei 1500 g filtriert und anschließend jeweils 65 μl in ein RNase freies Mikrofugengefäß aliquotiert werden. Vor Durchführung eines Experiments wird ein solches 65 μl Gelaliquot mit 1 μl Farbstoffkonzentrat versetzt. Das vor Licht geschützte Farbstoffkonzentrat soll vor Gebrauch für 10 Sekunden gevortext werden. Die Gel-Farbstoff-Mischung wird bis zur vollständigen Homogenisierung gevortext und 10 Minuten bei RT und 13000 g zentrifugiert. Dieses Gemisch soll nur einen Tag lang verwendet werden.

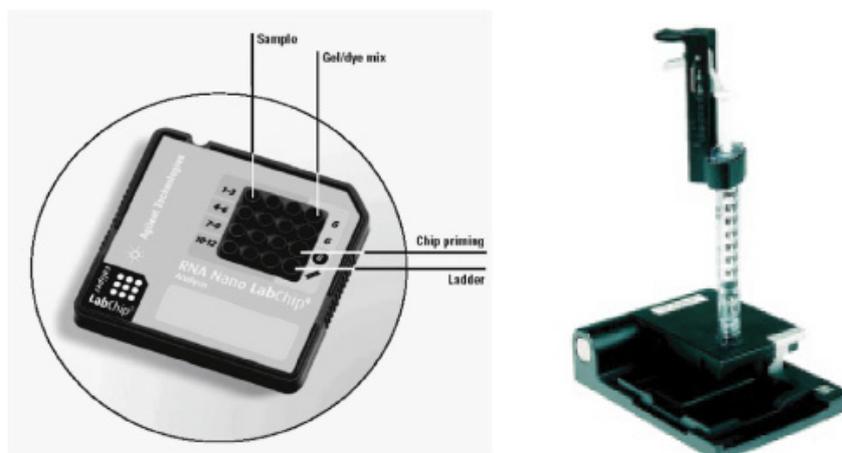


Abbildung 10: links: RNA-Nano-Cip, rechts: Chip Priming Station

Nun kann ein neuer RNA-Nano Chip aus der versiegelten Tüte entnommen und in die Chip Priming Station eingelegt werden. Der Kolben der Spritze in der Chip Priming Station muß auf 1 ml eingestellt werden. Als erstes werden 9 µl Gel-Farbstoff-Mix auf den Boden des Loches G pipettiert und die Chip Priming Station verschlossen. Der Kolben wird solange heruntergedrückt bis er von selbst nach einem Klickgeräusch gehalten wird. Nach 30 Sekunden Wartezeit soll der Kolben gelöst werden. Durch Kolbendruck in der Chip Priming Station wird der Gel Farbstoff Mix verteilt. Damit genügend Gel im Chip ist, werden weitere 9 µl des Gel-Farbstoff-Mixes in die Löcher pipettiert, die mit G markiert sind. Dann werden 5 µl Marker-Reagenz sowohl in das Well, das mit dem Leitersymbol gekennzeichnet ist, als auch in die 12 Probenwells pipettiert. Leiter-Reagenz und Proben müssen für 2 Minuten bei 70 °C denaturiert werden. Dann werden je 1 µl Probe in die entsprechenden Probenwells und 1 µl Leiterreagenz in das Well mit dem Leitersymbol pipettiert. Dann wird der vorbereitete Nanochip bei 2000 rpm für 1 Minute im IKA-Vortexer gevortext. Innerhalb von 5 Minuten soll der Chip nun in den Agilent 2100 Bioanalyser überführt und die Messung durchgeführt werden. Um eine Kontamination der RNA-Proben zu vermeiden, sollen die Elektroden des Bioanalyser vor dem Einlegen des Chips mit RNase-ZAP-Elektrodenreiniger und anschließend mit RNase freiem Wasser gereinigt werden. Nach Schließen des Deckels passen die Elektroden im Gehäuse in die Wells des Chips. Am Ende erhält man für jede Probe das Elektropherogramm der eukaryotischen Total-RNA. Im Falle einer völlig intakten RNA erhält man ein Elektropherogramm wie in Abbildung 11 über die entsprechende Software am Computer.

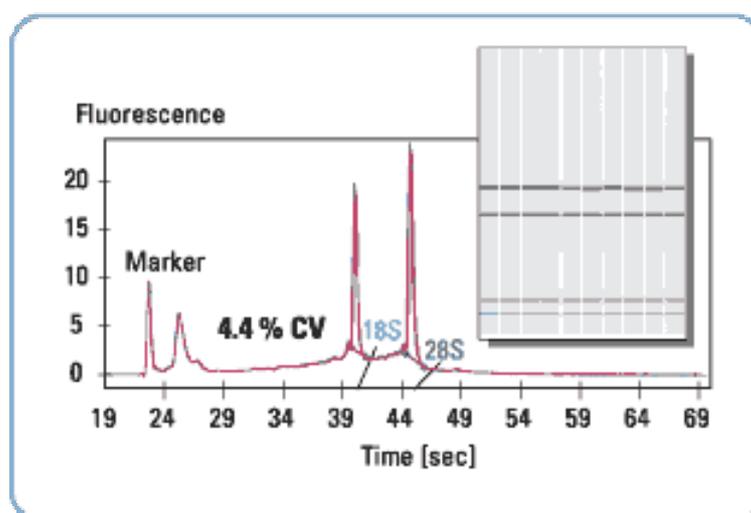


Abbildung 11: Elektropherogramm der eukaryotischen Total-RNA

Das abgebildete Elektropherogramm zeigt eine völlig intakte RNA mit idealerweise einem Marker-Peak und 2 Peaks der ribosomalen RNA (18S und 28S); oben rechts befindet sich eine entsprechende Abbildung der Banden auf dem Gel.

6.6 cDNA-Synthese

Möchte man mit der PCR-Methode RNA untersuchen, muß man diese erst in DNA umschreiben. Hierzu nutzt man Reverse Transkriptasen, wie zum Beispiel M-MLV-(Moloney murine leukemia virus)-Reverse Transkriptase. Die Reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus (MMLV-Reverse Transkriptase) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit RNaseH-Aktivität. Ihr Arbeitsoptimum liegt bei 37 ° C, das Maximum bei 42 ° C. Bei der hier verwendeten SuperskriptTM III Reversen Transkriptase von Invitrogen handelt es sich um eine modifizierte MMLV-Reverse Transkriptase mit reduzierter RNaseH-Aktivität und gesteigerter Thermostabilität. Das ermöglicht deutlich längere Transkripte.

Als Primer haben wir Random-Primer verwendet. Dabei handelt es sich um zufällige Hexamerprimer (random hexamers), die irgendwo in die mRNA hybridisieren. Auf diese Weise sind anschließend alle mRNA-Bereiche in der cDNA vertreten. Der neu gebildete DNA-Strang wird auch als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet. Die gesamte cDNA-Synthese ist eine RT-PCR. Im ersten Schritt wird die RNA mit der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Danach wird diese cDNA durch die DNA-Polymerase-Eigenschaften der Reversen Transkriptase amplifiziert. Mit dieser amplifizierten cDNA führen wir anschließend weitere Real-Time-PCR-Analysen durch.

6.6.1 Protokoll

Ein 2 µg RNA entsprechendes Volumen wird mit 1,8 µl Random Primer und RNase freiem Wasser auf 13 µl in ein Reaktionsgefäß pipettiert und durch vortexen homogenisiert. Diese Mischung wird 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Anschließend lässt man die Probe 5 Minuten auf Eis abkühlen, damit die Primer hybridisieren können. Dann pipettieren wir zu jeder Probe 7 µl eines weiteren Mixes. Dieser besteht pro Ansatz aus:

- 4 µl 5×First-Strand Puffer
- 1 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10 mM jeweils)
- 1 µl DTT
- 1 µl SuperScriptTMIII Reverse Transkriptase

Diese Mischung wird homogenisiert und für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Zum Schluß inaktiviert man die Reverse Transkriptase bei 70°C für 10 Minuten. Diese cDNA kann bei -20°C gelagert und für nachfolgende Real Time-PCR-Experimente verwendet werden.

6.7 Real time quantitative PCR

Die Real-Time-quantitative-PCR ist eine Amplifizierungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus (daher der Name „Real Time“) durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Für die Real-Time-PCR wird oft die Abkürzung RT-PCR verwendet, was aber auch zu Verwechslungen führen kann, da auch die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion so abgekürzt wird (siehe cDNA-Synthese).

6.7.1 Prinzip einer RT-PCR

Zusätzlich zu den beiden Primern, Enzym, Puffer, dNTPs und Mg^{2+} , die in jeder PCR vorhanden sind, befindet sich eine Sonde (kurzes Stück einzelsträngiger DNA) in dieser Reaktion. Sie bindet an eine Gensequenz zwischen den beiden Primern und ist mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Am 5'Ende befindet sich ein Reporter-, am 3'Ende ein Quencher-molekül. Das Reportermolekül kann nach Anregung ein Fluoreszenzsignal aussenden. Das Quencher-molekül kann dieses Fluoreszenzsignal löschen, wenn es sich in der Nähe des Reportermoleküls befindet (Fluorescence resonance energy transfer = FRET). In der intakten Sonde liegt genau dieser Fall vor. Es wird kein Fluoreszenzsignal abgegeben. Während der PCR werden beide Primer mittels der Taq-Polymerase solange verlängert bis sie auf die Sonde treffen. Durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde abgebaut. Damit werden Reporter- und Quencher-molekül voneinander getrennt. Das Quencher-molekül kann das Fluoreszenzsignal des Reportermoleküls nicht mehr löschen, die Fluoreszenz nimmt zu. In jedem Zyklus werden weitere Reportermoleküle freigesetzt. Die Stärke der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes ist proportional zur gebildeten DNA-Menge. Da diese Reporterfluoreszenz alle 7 Sekunden gemessen wird, kann relativ einfach der Verlauf der PCR-Reaktion verfolgt werden. Innerhalb der PCR-Kurve wählt man dann einen geeigneten Punkt für die Quantifizierung.

Ein weiterer großer Vorteil dieser Methode ist, dass die PCR-Tubes nach der PCR-Reaktion nicht mehr geöffnet werden müssen, da die Messungen und Quantifizierungen nach Beendigung der PCR-Reaktion abgeschlossen sind. Es entfällt somit die teilweise aufwendige Gelaufreinigung der PCR-Produkte und das Risiko einer Kontamination durch PCR-Produkte.

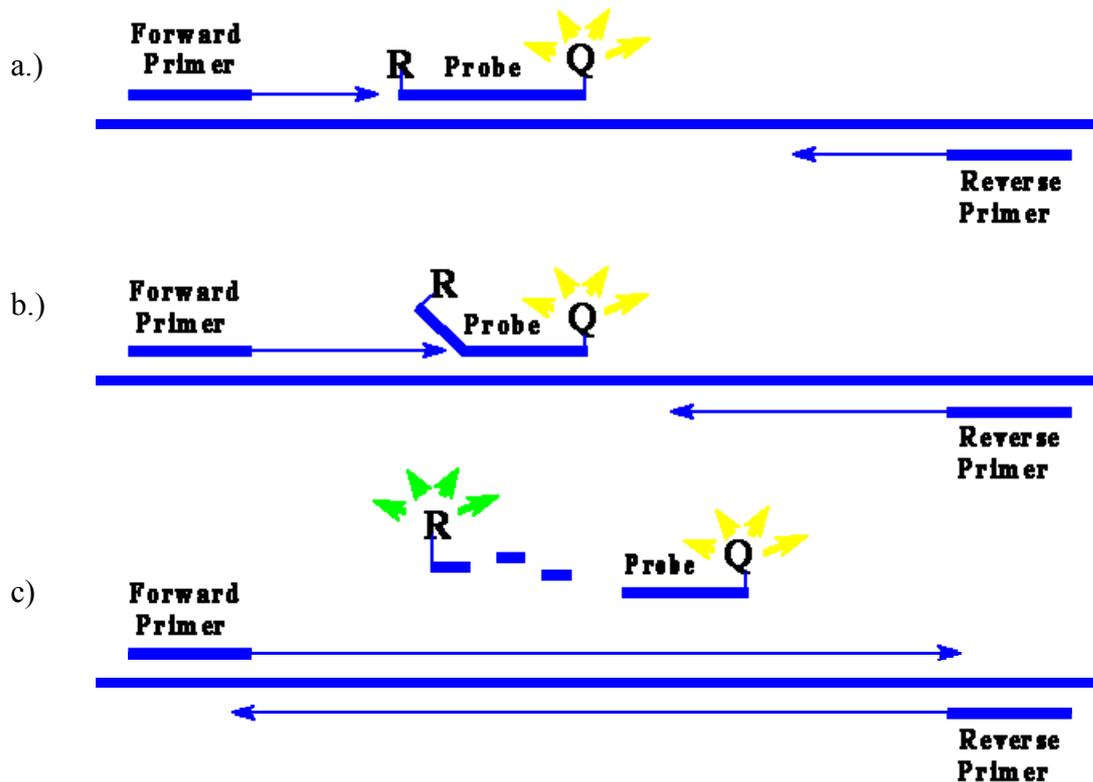


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Real time PCR

a.) Sequenz-spezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer, b.) Primerextension und Sondenhydrolyse, c.) Das PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert. Die Farbstoffe werden getrennt. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle wächst das Reporter-Signal.

6.7.2 Interkalierende Farbstoffe

Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen (z.B. Ethidiumbromid oder SYBR[®]Green I). Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein (interkalieren) bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Ziel-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann.

6.7.3 Grundbegriffe

Begriffe	Definitionen
Amplicon	kurzes DNA-Segment, das während der PCR amplifiziert wird
Amplification plot	grafische Darstellung: Fluoreszenzsignal gegen die Zyklenzahl
Basislinie	einleitende PCR-Zyklen, in denen wenig Fluoreszenzsignal meßbar ist
Threshold	Der Schwellwert wird so gesetzt, daß er über der Basislinie liegt, aber ausreichend niedrig ist, um noch in der exponentiellen Wachstumsphase der Amplifikationskurve zu liegen.
Threshold cycle C_T	Zyklusnummer, in welcher die Fluoreszenz den Treshold durchquert
Kalibrator	Probe, die für vergleichende Studien genutzt wird
endogene Kontrolle	internes Kontrollgen, das in allen Proben vorhanden ist; Durch den Gebrauch der endogenen Kontrolle als aktive Referenz, kann man Unterschiede in Total-RNA-Mengen normalisieren.
NTC	Probe, die kein Template enthält und zur Verifizierung der Amplifikationsqualität dient
passive Referenz	Farbstoff, der eine interne Fluoreszenz-Referenz darstellt, zu der das Reporterfarbstoffsignal während der Datenanalyse normalisiert werden kann; Fluoreszenzschwankungen, die durch Konzentrations- und Volumenänderungen bedingt sind, werden dadurch korrigiert.
Reporterfarbstoff	Farbstoff, der sich am 5'Ende der TaqMan-Sonde befindet
normalisierter Reporter (Rn)	Verhältnis: Fluoreszenz-Emissions-Intensität des Reporterfarbstoffs zu Fluoreszenz-Emissions-intensität des passiven Referenzfarbstoffes
delta Rn	$R_n(\text{Template}) - R_n(\text{NTC})$
Standard	Probe bekannter Konzentration, die für eine Standardkurve genutzt wird

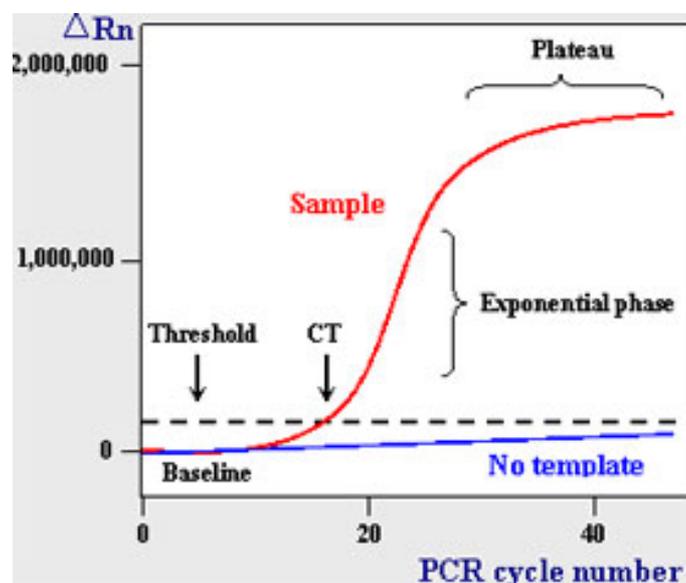


Abbildung 13: Eigenschaften des Amplifikation Plots

6.7.4 Minimierung von DNA-Kontaminationen

Während der Amplifizierung besteht die Gefahr einer gleichzeitigen Amplifizierung von DNA, die ungewollt in die PCR-Proben gelangt ist. Diese kann aus DNA-Template-Kontrollen oder aus vorhergehenden PCR-Reaktionen stammen (PCR-carryover).

Sybergreen I Farbstoff interkaliert in alle doppelsträngigen DNA-Moleküle. Bei der Verwendung von SyberGreen I Farbstoff wird mit Hilfe einer **Schmelzkurve oder Gelanalyse** immer die Bildung von nichtspezifischen Produkten kontrolliert. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht und die DNA dadurch aufgeschmolzen. Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur geht der Doppelstrang wieder in ein einzelsträngiges Molekül über. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Weiterhin sollte man beim Primerdesign bemüht sein, **Exon-überspannte Primer** zu designen, um eine gleichzeitige Detektion von genomischer DNA bei der PCR zu vermeiden.

Der Gebrauch von **AmpErase[®] uracil N-glycosylase (UNG)** minimiert die Reamplifikation von Carryover-Produkten. UNG wirkt auf einzel- und doppelsträngige dU-enthaltende DNA (bei Real Time PCR gebildete DNA). Es hydrolysiert die Uracil-glycosidische Bindung an dU-enthaltenden Orten der DNA. Es erfolgt die Freisetzung von Uracil. Dabei wird ein alkalisensitiver A-Pyrimidinort in der DNA erzeugt. Das Enzym hat keine Wirkung auf RNA oder dT-enthaltende DNA (entsteht bei cDNA-Synthese). Die vor der eigentlichen Real Time PCR durchzuführende UNG-Behandlung verhindert so die Reamplifikation der PCR-Produkte aus vorhergehenden Real Time PCR-Experimenten. Bei Gebrauch von TaqMan Fast Universal PCR Master Mix ist zu beachten, daß keine UNG enthalten ist und UNG separat zugesetzt werden muß. Im Syber-Mastermix ist UNG bereits enthalten.

6.7.5 Primer- und Sondendesign

Die Primer Express[®] ABI PRISM Software wird für das Design der verwendeten Primer und Sonden genutzt.

Zum Design sind wir folgendermaßen vorgegangen:

Das zu untersuchende Gen wird im Internet unter NCBI Genomen Human Resources gesucht und die codierende Sequenz in ein Text-Dokument kopiert. Mittels NCBI Genome Human Resources können auch die Exon-Intron-Grenzen gefunden und im Text-Dokument entsprechend markiert werden. Unter Nutzung der Software Primer Express® können dann entsprechende Primer und Sonden gefunden werden. Die Software berücksichtigt die in der Tabelle aufgeführten notwendigen Kriterien zum optimalen Primer- und Sondendesign. Wir haben versucht, die Primer oder die Sonde Exon-überspannt zu designen, um eine Detektion von genomischer DNA auszuschließen.

Primer	Sonde
% GC-Gehalt 30-80 %	
nicht mehr als 3 G's in Folge	
Primer TM von 58 – 60 ° C vorwärts- und rückwärts-Primer sind so nahe wie möglich an der Sonde 5 Nukleotide am 3 'Ende haben nur 1 oder 2 Gs und Cs.	TM von 68 – 70 ° C kein G am 5'-Ende Wahl der Sonde vom Strang, der mehr C's als G's enthält
Amplikon-Länge weniger als 150 bp	

6.7.6 Optimale Primerkonzentrationen

Im Allgemeinen können Standard-Primer- und Sondenkonzentrationen verwendet werden. Falls die PCR nicht mit optimaler Effektivität läuft, wird eine Primeroptimierungsmatrix pipettiert.

Standardkonzentrationen

	5'5'Nuklease-Assay	SyberGreen I – Assay
Primer forward	300 nM	300 nM
Primer reverse	300 nM	300 nM
Sonde	200 nM	keine

Für die hier verwendeten Primer ist die PCR bereits bei den jeweiligen Standardkonzentrationen optimal verlaufen, so dass für kein Gen das Pipettieren einer Primeroptimierungsmatrix notwendig gewesen ist.

6.7.7 Protokoll

Berechnung der notwendigen Ansätze

1 × NTC		3,5
5 × Standard	* 3,5	17,5
X × Proben		X
3 × Rest		10,5
		Summe (entspricht X Ansätzen)

Fast RT-PCR-Experimente

Reaktionsmix	1 Ansatz	X Ansätze
Fast Mastermix	5 µl	5 µl * X
Sonde	0,4 µl	0,4 µl * X
Primer forward	0,3 µl	0,3 µl * X
Primer reverse	0,3 µl	0,3 µl * X
Wasser	1,5 µl	1,5 µl * X
UNG	0,1 µl	0,1 µl * X

33,6 µl des Reaktionsmixes werden in jedem Reaktionsgefäß vorgelegt und entweder 1,4 µl der jeweiligen cDNA oder 1,4 µl Wasser für NTC dazupipettiert.

Anschließend werden jeweils 10 µl dieses Gemisches in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Der Ansatz ist jeweils ausreichend für eine 3fach-Bestimmung.

Syber-Experimente

Reaktionsmix	1 Ansatz	X Ansätze
Syber Mastermix	10 µl	10 µl * X
Primer forward	0,6 µl	0,6 µl * X
Primer reverse	0,6 µl	0,6 µl * X
Wasser	8 µl	8 µl * X

67,2 µl des Reaktionsmixes werden in jedem Reaktionsgefäß vorgelegt und entweder 2,81 µl cDNA oder 2,81 µl Wasser für NTC dazupipettiert.

Anschließend werden jeweils 20 µl dieses Gemisches in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Der Ansatz ist jeweils ausreichend für 3-fach-Bestimmungen.

6.7.8 PCR-Programme

PCR-Bedingungen für cDNA-Amplifikation bei Verwendung von TaqMan Fast Universal PCR-Mastermix (2×), No AmpErase UNG für das 7500 Fast System sind folgende:

Zeiten und Temperaturen			
einleitende Schritte		PCR (45 Zyklen)	
UNG- Aktivierung	Denaturierung	Schmelzen	Annelieren/ Extension
2 Min. 50 ° C	10 Min. 95 ° C	3 Sek. 95 ° C	30 Sek. 60 ° C

PCR-Bedingungen für cDNA-Amplifikation bei Verwendung von SyberGreen I:

Zeiten und Temperaturen			
einleitende Schritte		PCR (45 Zyklen)	
UNG- Aktivierung	Denaturierung	Schmelzen	Annelieren/ Extension
2 Min. 50 ° C	10 Min. 95 ° C	15 Sek. 95 ° C	1 Min. 60 ° C

6.7.9 Auswertung der RT-PCR-Ergebnisse

Bei der Analyse der Daten der Genexpressionsassays geht man folgendermaßen vor:

- * Auswerten des Amplifikation plots für die gesamte Platte
- * Baseline- und Treshold-Werte festlegen
- * Quantifizierung

6.8 Zellkultur

6.8.1 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren werden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium aufgenommen. 1 ml des Zellgemisches wird dann in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgt in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox in einer -80°C Kühltruhe. Am nächsten Tag werden die Röhrchen in den Flüssigstickstofftank überführt.

Zum Auftauen der Zellen taut man diese möglichst schnell im 37 ° C Wasserbad auf, pipettiert Medium hinzu, mischt vorsichtig und zentrifugiert anschließend ab. Der Überstand mit dem zelltoxischen DMSO wird abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen.

6.8.2 Zellkultivierung

Die CASMC werden von Passage 5 bis 9 genutzt. Die Zellen erhalten alle 2 bis 3 Tage neues Medium. Die AT1aR ko-VSMC werden wie die CASMC kultiviert.

Die U937-Suspensionszellen wachsen bis zu einer maximalen Dichte von 5×10^5 Zellen pro Milliliter. Bei Erreichen dieser Zelldichte werden die Zellen zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten bei Raumtemperatur), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in neuem Medium aufgenommen.

6.8.3 Passagieren

Die adhärennten CASMC wachsen bis 70 % Konfluenz. Um die Zellen zu passagieren, wird das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und Trypsin auf den Zellen möglichst sparsam verteilt. Die Inkubation mit dem Trypsin erfolgt für etwa 5 Minuten im Brutschrank. Danach können die Zellen durch leichtes Klopfen an der Flasche noch besser gelöst werden. Um dann das zytotoxische Trypsin zu inaktivieren, wird etwas Medium auf die Zellen gegeben. Das Gemisch wird dann in ein Falcon überführt und die Zellen bei 1000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer werden die Zellen neu ausgesät.

6.8.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wird die Neubauer-Zählkammer verwendet. Zunächst werden die Zählkammer und das Deckglas mit Alkohol gereinigt, die Stege leicht angefeuchtet und das Deckglas vorsichtig aufgeschoben bis die sogenannten Newtonringe erschienen. Das Erscheinen der Newtonringe zeigt an, dass das Deckglas richtig angebracht und die Tiefe (0,1 mm) der Zählkammer richtig eingestellt ist. 10 µl Zellsuspension werden dann in die Zählkammer gefüllt. Die Kammer wird dann unter das Mikroskop gelegt und so eingestellt, dass die Einteilungslinien der Kammer sichtbar werden.

Jedes große Quadrat der Zählkammer hat eine Fläche von 1 mm², dies ergibt eine Tiefe von 0,1 mm, also ein Volumen von 0,1 µl. 4 große Quadrate werden bei jeder Zellzählung ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Der Mittelwert wird mit 10⁴ multipliziert; man erhält dann die Zellzahl pro Milliliter. Die Gesamtzahl ergibt sich aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zahl pro ml.

6.8.5 Stimulationen von U937-Zellen und CASMC für Proteinisolierungen

Vor einer Stimulation werden die Zellen für 24 Stunden mit dem jeweiligen Mangelmedium inkubiert, um alle Zellen in die G₀-Phase zu bekommen. Die CASMC werden auf Schalen mit 4 cm Durchmesser ausgesät und bis zu 70 % Konfluenz in normalem Medium kultiviert. Bei Erreichen dieser Zelldichte wird das alte Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und das Mangelmedium hinzugegeben.

Die U937-Zellen werden abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in Mangelmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer werden jeweils 0,5 bis 1 × 10⁶ Zellen in 2 ml Mangelmedium auf 6-Loch-Platten ausgesät.

Für die eigentlichen Stimulationen inkubiert man alle Zellen mit Losartan und PD123319 und dem jeweilig zu untersuchenden Inhibitor für 30 Minuten vor. Danach erfolgt die eigentliche Stimulation mit Renin oder Prorenin. Nach Ablauf der entsprechenden Stimulationszeiten werden die Zellen geerntet und lysiert.

Die in der Zellkultur eingesetzten Konzentrationen für Renin, Prorenin und die Inhibitoren sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

	Konzentrationen
Renin	10 nM
Prorenin	2 nM
Losartan (AT1Rezeptor-Inhibitor)	10 μ M
HRP ((P)RR-Inhibitor)	1 μ M
Aliskiren (Renininhibitor)	10 μ M
PD123319 (AT2Rezeptor-Inhibitor)	10 μ M
PD98059 (MEK-Inhibitor)	100 nM
Gö 6976 (PKC$_{\alpha/\beta}$-Inhibitor)	10 nM

6.8.6 Zellyse

Während der Zellyse werden die Zellen aufgebrochen und setzen Proteasen frei, welche die zu isolierenden Proteine degradieren können. Daher lagern wir die Proben während der Zellyse ständig auf Eis und setzen dem Lysepuffer Proteaseinhibitoren immer frisch zu. Da in dieser Arbeit Enzymaktivitäten (Phosphorylierungen von Proteinen) untersucht werden, wird ein nicht-denaturierender Zellysispuffer mit zugestzten Phosphataseinhibitoren verwendet. Für Ernte und Zellyse wird dann folgendermaßen vorgegangen:

Bei den adhärennten CASMC wird zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. 100 μ l Lysepuffer werden auf den Boden der Zellkulturschale pipettiert und anschließend die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Das Zellysatsat wird in ein Reaktionsgefäß überführt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Zellysatsat wird in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, kurz in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -20 ° C gelagert.

Die Suspensionszellen (U937-Zellen) werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 μ l Lysepuffer resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentifugation (14000 rpm, 15 Minuten, 4 ° C) wird das Zellysatsat in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -20 ° C aufbewahrt.

6.8.7 Proteinbestimmung mittels Bradford

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen (Meßbereich $\mu\text{g/ml}$). Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung sowohl mit den kationischen als auch mit den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Das Absorptionsspektrum der ungebundenen (kationischen) rotgefärbten Form hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert, das Absorptionsspektrum verschiebt sich auf ein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Da der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes außerdem sehr viel höher als der des freien Farbstoffs ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Bildung des Komplexes mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Das Ausmaß der Farbreaktion ist von Protein zu Protein verschieden. Man braucht daher zur genauen Konzentrationsbestimmung eine Kalibrationslösung des zu bestimmenden Proteins. Wenn diese nicht gereinigt zur Verfügung steht bzw. wenn die Proteinkonzentration von Gemischen bestimmt werden soll, werden sogenannte Standardproteine zur Kalibrierung eingesetzt (z.B. Chymotrypsin, Lysozym oder BSA). Dabei können je nach Zusammensetzung des Proteingemisches für gleiche Proteinmengen unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden. Der Test ist damit nur semi-quantitativ. Dies ist die Hauptschwäche der Bradfordbestimmung. Ihre Vorteile sind hohe Sensitivität und die einfache und schnelle Durchführung.

Zur Proteinbestimmung der Lysate wird auch in dieser Arbeit eine Standardreihe pipettiert, mit welcher die Konzentrationen der Proben ermittelt werden. Für die Standardreihe werden BSA mit PBS wie folgt verdünnt: 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 24 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$ und 40 $\mu\text{g/ml}$. Für die Standardwerte, den Nullwert und die Proben ermitteln wir jeweils Dreifachwerte. Das Probenlysate wird mit PBS 1:100 (CASMC-Zelllysate) oder 1:400 (U937-Zelllysate) verdünnt, gut gemischt und anschließend je dreimal 50 μl in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte pipettiert. Danach werden je 200 μl Bradfordlösung zu den Probenverdünnungen pipettiert und eventuelle Luftblasen entfernt. Anschließend kann die Absorption bei 595 nm im TECAN-Plattenreader gemessen werden. Die Konzentrationen werden unter Berücksichtigung der Verdünnung über die Standardreihe errechnet.

6.9 Westernblotanalyse

6.9.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist wahrscheinlich die am meisten genutzte analytische Technik zur Trennung und Charakterisierung von Proteinen. Eine Lösung von Acrylamid und Bisacrylamid wird polymerisiert. Acrylamid bildet lineare Polymere. Bisacrylamid führt Querverbindungen zwischen die Acrylamidketten ein. Die Porengröße wird durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid und durch die Konzentration der Acrylamide bestimmt. Ein hoher Verhältniswert von Bisacrylamid zu Acrylamid und hohe Acrylamidkonzentrationen bewirken geringe elektrophoretische Mobilität. Polymerisation von Acrylamid- und Bisacrylamidmonomeren wird durch Ammoniumpersulfat (APS) induziert, welches schnell zerfällt und freie Radikale bildet. TEMED, ein Stabilisator für freie Radikale, wird zugesetzt, um die Polymerisation zu unterstützen. Sodiumdodecylsulfat (SDS) ist ein amphiphiles Detergenz. Es besitzt eine anionische Gruppe und einen lipophilen Schwanz. Es bindet nicht-kovalent an Proteine mit einer Stöchiometrie von ungefähr einem SDS-Molekül pro 2 Aminosäuren. SDS bewirkt eine Denaturierung und Dissoziation der Proteine und verleiht ihnen die negative Ladung. Demzufolge ist in der Anwesenheit von SDS die intrinsische Ladung des Proteins maskiert. Während SDS PAGE wandern alle Proteine zur Anode (positiv geladene Elektrode).

Die spezifische Faltung eines Proteins trägt nicht zum Laufverhalten bei, da die Proben mit β -Mercaptoethanol, das im Probenpuffer enthalten ist, vorbehandelt werden, was eine Zerstörung der Disulfidbrücken zwischen Cysteinen bewirkt. Zur vollständigen Denaturierung werden die Proteine für 5 Minuten bei 95 ° C erhitzt. Während der PAGE ergibt sich die Migrationsrate der SDS-beladenen Proteine also nur aus dem Molekulargewicht.

Für die Vorbereitung eines diskontinuierlichen SDS-PAGE wird folgendermaßen vorgegangen:

Die beiden Glasplatten für ein 1 mm Gel werden mit Ethanol gereinigt, zusammengebaut und im Gießstand fixiert. Das Trenngel wird nach unten stehendem Schema pipettiert. APS und TEMED werden als letztes hinzugefügt und die Lösung zwischen die Platten pipettiert. Das Trenngel wird bis etwa 1 cm unter den Rand der Kammtaschen gegossen. Das Gel wird mit Isopropanol überschichtet und polymerisiert für eine halbe bis eine Stunde aus.

Zusammensetzung für verschiedene Volumina des Trenngels

Trenngel 10 %	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml
Wasser	1,9 ml	4,0 ml	5,9 ml	7,9 ml	9,9 ml
30 % Acrylamid Mix	1,7 ml	3,3 ml	5,0 ml	6,7 ml	8,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 ml	2,5 ml	3,8 ml	5,0 ml	6,3 ml
10 % SDS	50 µl	100 µl	150 µl	210 µl	250 µl
10 % APS	50 µl	100 µl	150 µl	210 µl	250 µl
TEMED	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl

Nach vollständiger Entfernung von Isopropanol wird das Sammelgel vorbereitet, auf das Trenngel pipettiert und der Probenaschenkamm gesteckt.

Zusammensetzung für 2 Sammelgele (5ml sind ausreichend für 1 Sammelgel)

Sammelgel 5,1 %	10 ml
Wasser	6,8 ml
30 % Acrylamid Mix	1,7 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	1,25 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

6.9.2 Probenvorbereitung

Pro Tasche werden 10-20 µg Protein verwendet. Die 10-20 µg entsprechenden µl Volumen werden mit PBS auf 20 µl aufgefüllt und mit 4 µl Probenpuffer (6×) versetzt. Die Proben werden dann auf dem Heizblock 5 Minuten bei 95 ° C vollständig denaturiert und wieder abgekühlt. Je 20 µl der Proben werden dann in die Taschen pipettiert.

6.9.3 Elektrophorese

Nach dem Auspolymerisieren wird die Gelkassette aus dem Gießstand entnommen und in die Elektrophoresekammer eingebaut. Der Kamm wird aus den Gelen entfernt. Die Elektrophoresekammer wird an die Stromquelle angeschlossen. Im Sammelgel wird eine Spannung von 80 V und im Trenngel von 140 V verwendet. Am Ende der Elektrophorese wird die Stromquelle ausgeschaltet und die Apparatur auseinander gebaut.

6.9.4 Blotten

Western Blot bezeichnet die Übertragung (engl. Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran. Hier können anschließend die Proteine über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden. Die Übertragung kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden: mittels Diffusion, Kapillarwirkung oder Elektrophorese.

Durch die vorangegangene Elektrophorese sind die Proteine in Proteinbanden aufgetrennt. Beim Blotten wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Elektroblothing ist eine Transfermethode, die die Tatsache ausnutzt, dass SDS die Proteine negativ auflädt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran in Richtung des elektrischen Stroms. Auf der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten – die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich (z.B. Antikörperbindung). Nach diesem Vorgang kann das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen werden. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht aber ihre Quartärstruktur.

Zum Blotten wird folgendermaßen vorgegangen:

Zwei Lagen Whatmanpapier und die Nitrocellulosemembran werden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und im Blot-Puffer getränkt. Das Gel wird von den Glasplatten entfernt und der Blot wie in der unteren Abbildung auf der Blotapparatur zusammgebaut. Zur Entfernung von Luftblasen wird ein Glasstab verwendet. Für ein Gel der Größe $5,3 \times 3$ cm wird eine Stromstärke von 11 mA angelegt. Das Blotten erfolgt für 50 Minuten.



Abbildung 14: Anordnung des Gels, der Nitrocellulosemembran und der Filter in der Blotapparatur

6.9.5 Ponceaufärbung

Der Transfer der Proteine kann auf Einheitlichkeit und Gesamteffektivität durch verschiedene Färbemethoden kontrolliert werden. Hier wird die Ponceaufärbemethode genutzt. Dazu

inkubieren wir die Membran nach dem Transfer für 5 Minuten in der Ponceaufärbelösung und waschen anschließend den Überschuß der Farblösung mit Wasser ab bis die Proteinbanden gut zu erkennen sind. Um die Nitrocellulose-Membran vollständig zu entfärben, inkubieren wir sie für weitere 5 Minuten in TBS-T.

6.9.6 Blocken der Membran

Membranen werden als Transferziel gewählt, weil sie in der Lage sind, Proteine zu binden. Wenn jetzt eine weitere Detektion bestimmter Proteine über Antikörper erfolgen soll, muß berücksichtigt werden, dass auch Antikörper leider Proteine sind, die sich nichtspezifisch an alle diese Bindungsstellen auf der Membran anlagern und einen spezifischen Nachweis des Antigens unmöglich machen. Das Blockieren der freien Bindungsstellen erfolgt mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein. In dieser Arbeit wurde 1 %ige Peptonlösung in 1×TBS-T verwendet und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C jeweils auf dem Schüttler inkubiert.

6.9.7 Antikörperreaktionen

Die Membran wird dann mit einer verdünnten Antikörper-Lösung behandelt, wobei die Antikörper spezifisch gegen bestimmte Proteine (hier: ERK oder pERK, eIF) auf der Membran gerichtet sind. Einige Waschschrte entfernen schwächer haftenden unspezifisch gebundenen Antikörper von der Membran. Eine zweite Antikörperlösung mit dem Sekundär-Antikörper wird auf die Membran gegeben. Der Antikörper dieser zweiten Antikörperlösung ist spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet, in der Regel gegen die Fc-Bereiche des 1. Antikörpers. Der 2. Antikörper bindet also an den 1. Antikörper.

Der 1. Antikörper wird entsprechend der unteren Tabelle verdünnt. Dann werden 7,5 ml dieser Lösung auf die Nitrozellulosemembran gegeben und für 3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Antikörper(Cell Signaling)	Verdünnung	µl auf 15 ml mit 1 % Pepton in TBS-T
pERK	1:1000	15 µl
ERK	1:1000	15 µl
eIF4E	1:6000	2,5 µl

Dann wird die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper Anti-rabbit POD (Jackson Immunoresearch) wird 1:5000 mit 1 % Pepton in TBS-T verdünnt. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler mit jeweils 7,5 ml dieser Verdünnung. Anschließend wird die Membran wieder dreimal mit TBS-T gewaschen.

6.9.8 Antikörperdetektion

Nach dem letzten Waschschrift erfolgt die Antikörperdetektion. Bei Enzym-Antikörperkonjugaten wird durch die hier verwendete Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradisch peroxidase) eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Die Meerrettich-Peroxidase ist an den sekundären Antikörper gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann.

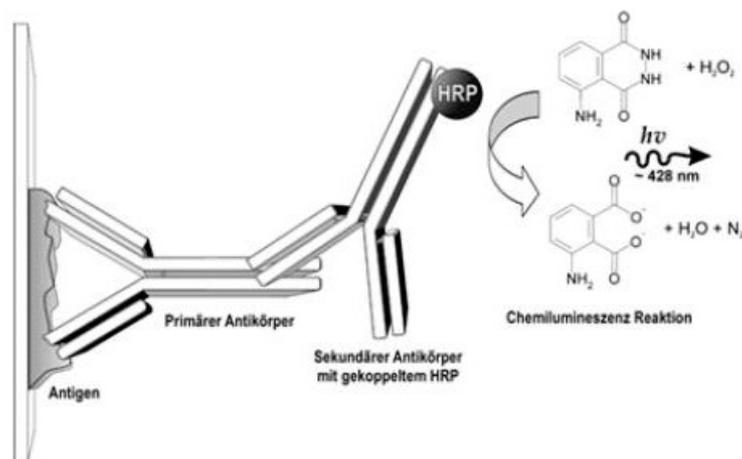


Abbildung 15: Schema der Immundetektion

Der primäre Antikörper bindet an sein Antigen, welches auf einer Membran fixiert ist. An diesen wiederum bindet der sekundäre Antikörper, der mit dem Enzym Horseradish-Peroxidase gekoppelt ist. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Das ECL-Reagenz wird zu gleichen Teilen gemischt (pro Blot je 1 ml, Endvolumen 2 ml) und auf die Membran aufgetragen. Die Inkubation erfolgt für 1 Minute bei RT. Nach Abtropfen des Blottes wird dieser in Klarsichtfolie verpackt und in der Dunkelkammer oder im Imager entwickelt.

6.10 Kinase-Assay

Um herauszufinden, ob das in unseren Westernblots gebildete pERK nach Renin- oder Proreninstimulation katalytisch aktiv ist und dadurch den nachfolgenden Transkriptionsfaktor ELK phosphoryliert, wird ein entsprechendes Kinase-Assay durchgeführt.

6.10.1 Prinzip

Nichtradioaktives ERK-Kinase-Assay stellt alle Reagenzien zur Verfügung, die für eine Messung der ERK-Aktivität in den Zellen notwendig sind. Immobilisierter pERK-Antikörper wird genutzt, um aktives ERK aus Zellextrakten zu immunopräzipitieren. Dann wird ein in-vitro Kinase-Assay durchgeführt, in dem ELK1-Protein als Substrat genutzt wird. ELK1-Phosphorylierung wird dann mittels Western blot durch den Gebrauch von Phospho-ELK-Antikörper (Ser383) nachgewiesen.

Das Kinase Assay wird mit U937-Zellen durchgeführt. Es werden 1×10^6 Zellen in 2 ml Mangelmedium in 6-Lochplatten ausgesät. Die Stimulation erfolgt nach 24 Stunden. Nach der Stimulation werden die Zellen geerntet. Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wird mit jeweils 500 μ l 1 \times Lysispuffer versetzt und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) hinzugefügt und dieser Ansatz 5 Minuten auf Eis inubiert. Dann wird 10 Minuten bei 4°C mit Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

6.10.2 Immunopräzipitation des immobilisierten Antikörpers

15 μ l des immobilisierten pERK-Antikörpers werden zu 200 μ l Zellysat (entspricht ungefähr 200 μ g Protein) pipettiert. Dieser Ansatz wird über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

6.10.3 Kinase Assay

Das Zellysat wird dann bei 14000 \times g für 1 Minute bei 4°C zentrifugiert. Das entstehende Pellet wird dann zweimal mit 500 μ l 1 \times Lysepuffer und zweimal mit 500 μ l 1 \times Kinasepuffer gewaschen. Dann wird das Pellet in 50 μ l 1 \times Kinasepuffer suspendiert und 200 μ M ATP und die erforderliche Menge Kinasesubstrat zugesetzt (ELK-Fusionsprotein, 1 μ g/Assay). Dieser Ansatz wird 30 Minuten bei 30°C auf dem Heizblock inkubiert. Danach wird die Reaktion mit 25 μ l 3 \times SDS-Probenpuffer beendet, gevortext und kurz zentrifugiert.

6.10.4 Western blot

Die Proben aus der Kinase-Assay-Reaktion werden für 5 Minuten bei 95-100°C erhitzt und 20 μ l pro Well auf ein SDS-PAGE-Gel geladen. Der Western blot wird dann wie unter Western blot beschrieben durchgeführt. Zum Blocken wird hier 5%ige Blockmilch in TBST

verwendet und eine Stunde geblockt. Als erster Antikörper wird pELK (Ser383) (1:1000-Verdünnung in 5 % BSA TBS-T) über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Als zweiter Antikörper wird HRP konjugierter zweiter Antikörper (1:2000 in 5 % BSA TBS-T) 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Zur Entwicklung wird der Blot 1 Minute mit 10 ml LumiGLOSubstrat bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Zum Schluß erfolgt die Entwicklung auf dem Röntgenfilm.

6.11 Durchflusszytometrie (FACS[®], Fluorescence Activated Cell Sorting)

In dieser Arbeit wird das Durchflusszytometer genutzt, um herauszufinden, ob der (P)RR in Monozyten und in und auf U937-Zellen lokalisiert ist. Weiter wird die Bindungsfähigkeit von Handle Region Peptid (HRP) an U937-Zellen untersucht.

6.11.1 Lokalisation des (P)RR in Monozyten und auf und in U937-Zellen

$0,5 \times 10^6$ Zellen enthaltende Zellsuspension wird bei 1000 rpm, 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird zunächst mit 1,4 ml PBS + 3 % FCS + 0,1 % Na-Acid gewaschen. Dann wird erneut bei 400 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Proben, die auf eine Lokalisation des (P)RR auf der Zellmembran untersucht werden sollen, können jetzt mit dem 1. Antikörper oder mit dem entsprechenden Präimmenserum inkubiert werden. Der spezifisch gegen (P)RR gerichtete Antikörper heißt 1623 und ist von G. Nguyen in Paris hergestellt worden. Er wird nach Vorschrift mit Puffer verdünnt und 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgt ein Waschschriff mit 1,6 ml Puffer, es wird wieder bei 400 g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann erfolgt die Inkubation eines 2. FITC-gelabelten Antikörpers, der gegen den 1. Antikörper gerichtet ist und an diesen bindet. Es handelt sich um FITC-gelabelten Esel- α -Kaninchen-Antikörper. Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler. Dann wird wieder mit 1,6 ml Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wird das Pellet in 400 μ l PBS + 1 % Formaldehyd resuspendiert. Diese Lösung wird in FACS-Röhrchen überführt und anschließend im Durchflußzytometer gemessen.

Soll die intrazelluläre Lokalisation des (P)RR untersucht werden, müssen die Zellen vor der entsprechenden Antikörperinkubation permeabilisiert werden. Dazu werden 100 μ l Lösung A vom „Fix and Perm Cell Permeabilization kit“ zum vorher gewaschenen Zellpellet pipettiert, kurz gevortext und 15 Minuten bei RT inkubiert. Dann werden 1,8 ml Puffer dazupipettiert

und 5 Minuten bei 400 g und RT zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach pipettiert man 100 µl Lösung B von „Fix and Perm Cell Permeabilization kit“ zum Zellpellet und inkubiert weitere 15 Minuten. In diese Suspension wird eine entsprechende Verdünnung des 1. Antikörpers pipettiert. Die Antikörperinkubation wird dann weiter, wie bei der Außenmarkierung beschrieben, durchgeführt und das Zellpellet nach dem letzten Waschvorgang auch in 400 µl PBS + 1 % Formaldehyd resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Fluoreszenz aller Proben wird dann im Durchflußzytometer gemessen und mittels der CellQuestPro-Software eine entsprechende Auswertung vorgenommen.

6.11.2 Bindung von FITC-HRP an U937-Zellen und an ES-Zellen

Um zu testen, ob HRP überhaupt und in Abhängigkeit von der Konzentration an U937-Zellen bindet, wird FITC-gelabeltes HRP verwendet. Es werden 1×10^6 U937-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und alle Wells mit Medium einheitlich auf 2 ml aufgefüllt. Die so angesetzten Zellen werden für 20 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Nach Zugabe der entsprechenden Verdünnung der FITC-HRP-Lösung (10^{-6} – 10^{-8} M) wird die Zellsuspension 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach werden 2 ml Suspension mit der Tropfpipette in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 300 g und 20°C zentrifugiert. Der Überstand kann abgesaugt und das Pellet in 500 µl PBS+1%PFA aufgenommen werden. Dann wird die Fluoreszenz der Proben im FACS-Gerät gemessen. Als Kontrollen dienen Zellen, die mit nichtgelabeltem HRP in einer Konzentration von 10^{-7} behandelt werden.

Um zu untersuchen, ob die Bindung von HRP an U937-Zellen kompetitiv ist, wird getestet, ob eine Vorinkubation mit einem Überschuß an ungelabeltem HRP (10^{-7} M) die Bindung von FITC-HRP (10^{-8} M) an U937-Zellen hemmt. Die Zellsuspension wird sowohl nach Zugabe von ungelabeltem HRP als auch von FITC-HRP 20 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zum Schluß werden die Proben im Durchflußzytometer gemessen.

Weiter inkubieren wir embryonale Stammzellen (ES-Zellen) RST307 (BayGenomics) mit FITC-HRP (10^{-7} M) oder mit nichtgelabeltem HRP (10^{-7} M) für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Diese Zellen haben eine „Genfalle“ für den (P)RR und tragen daher die Transmembrandomäne des (P)RR nicht. Nach der Inkubation werden die Zellen 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet wieder in 300 µl PBS+1 % PFA aufgenommen. Die Fluoreszenz der Proben wird dann sofort im FACS-Gerät gemessen.

6.12 ¹²⁵I-Renin- und ¹²⁵I-Proreninbindung in U937-Zellen

Die radioaktiven Bindungsexperimente sind in Kooperation mit Nguyen et al durchgeführt worden.

Die U937-Zellen werden mit 0,1 bis 0,2 nM gelabeltem Renin oder Prorenin für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden dann zentrifugiert und zweimal mit 1 ml Krebspuffer gewaschen. Dann wird die Radioaktivität in diesen Zellen gemessen. Dieser Wert entspricht sowohl spezifischer als auch unspezifischer Bindung von gelabeltem Renin oder Prorenin an die U937-Zellen. In einem weiteren Versuch werden U937-Zellen mit 0,1 bis 0,2 nM gelabeltem Renin oder Prorenin für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und dann ein Überschuß von kaltem Renin (1µM) oder kaltem Prorenin (350 nM) für weitere 2 Stunden zugesetzt. Die Zellen werden dann wieder zweimal mit Krebspuffer gewaschen und die Radioaktivität erneut gemessen. Der Wert dieser 2. Messung entspricht unspezifisch an die U937-Zellen gebundenem Renin oder Prorenin. Die spezifische Renin- oder Proreninbindung wird dann aus der Differenz zwischen totaler Bindung (1. Wert) und der Bindung in der Anwesenheit eines Überschusses an jeweils ungelabelten Verbindungen (2.Wert) ermittelt. Diese Differenz wird auf 100 % gesetzt. Die entsprechend ermittelten Bindungswerte nach Vorinkubation der Zellen mit Aliskiren oder HRP werden zu diesem Wert in Relation gesetzt.

6.13 Tierversuche

6.13.1 Albuminmessung

Ab der 5. Lebenswoche ist nach früheren Untersuchungen eine deutliche Albuminurie in den dTGR zu erwarten. Daher wird der Urin der Tiere ab der 5. Lebenswoche gesammelt. Diese Sammlung erfolgt dann bis zur 7. Lebenswoche. Dazu werden die Ratten für jeweils 24 Stunden einzeln in sogenannten metabolischen Käfigen gehalten. Durch die Konstruktion der Käfige kann der Urin getrennt gesammelt werden. Dann wird das Urinvolumen gemessen und eine spezifische Bestimmung des Albumingehaltes des Sammelurins mit Hilfe eines Enzyme-Linked Immunosorbent-Assays (ELISA) vorgenommen. Nach der ELISA-Messung von Albumin erhält man die Albuminkonzentrationen der Proben in mg/ml bzw. durch Multiplikation mit dem während der 24stündigen Urinsammlung gemessenen Urinvolumens die ausgeschiedene Albuminmenge in mg/24 h.

6.13.2 Cystatin C-Messung

Die Ratten in dieser Studie werden in der 7. Lebenswoche getötet und das Serum für die Cystatin C-Analyse gesammelt. Die Messung erfolgt im klinischen Labor des HELIOS-Klinikums nach Standardmethoden.

6.14 Immunozytochemie

In 7 Wochen alten Rattenherzen von Ratten mit unterschiedlich aktiviertem RAS soll untersucht werden, in welchen Modellen es zu einer erhöhten Ablagerung von Collagen I kommt. Dazu werden entsprechende Gewebeschnitte von Rattenherzen der SD, TGR(hRen), dTGR und dTGR+Aliskiren für 10 Minuten mit Aceton bei -20°C fixiert und anschließend trocknen lassen. Durch Behandlung der Schnitte mit PBS für 10 Minuten werden diese zum Quellen gebracht. Dann erfolgt eine Inkubation mit 10 % Eseserum für 45 Minuten in einer feuchten Kammer, um die Bindungsstellen der Gewebe zu blockieren. Der im folgenden zugegebene 1. Antikörper (Gab h Collagen Typ I; Verdünnung 1:300) verdrängt aufgrund seiner hohen Affinität während der 60 Minuten dauernden Inkubation in der feuchten Kammer das Eseserum von den entsprechenden Binungsstellen. Ungebundener 1. Antikörper wird durch gründliches Waschen mit PBS entfernt und der 2. Antikörper (D anti Goat-Cy3; Verdünnung 1:600) für 60 Minuten hinzugegeben. Es wird erneut gründlich mit TBS gewaschen. Die Objektträger werden von den Kammersystemen befreit und die gefärbten Gewebe in VectaShield Mounting Medium mit DAPI eingebettet. Die gefärbten Präparate werden mit dem Axioplan 2 betrachtet und mit Axion Vision 3 ausgewertet.

7 Ergebnisse

7.1 **In vitro-Experimente in humanen CASMC und U937-Zellen**

7.1.1 (P)RR-mRNA-Expression in humanen U937-Zellen und CASMC

Als erstes wird die (P)RR-mRNA-Expression in frisch isolierten humanen Monozyten, in U937-Zellen und in den Microsomen der U937-Zellen untersucht (Abbildung 16). In allen drei Proben ist (P)RR-mRNA gut exprimiert. In humanen Monozyten ist die (P)RR-Expression doppelt so hoch wie in U937-Zellen. In der Mikrosomenfraktion der U937-Zellen sind 50 % der gesamten mRNA-Expression von U937-Zellen zu finden, so daß im endoplasmatischen Retikulum (ER) viel (P)RR lokalisiert zu sein scheint.

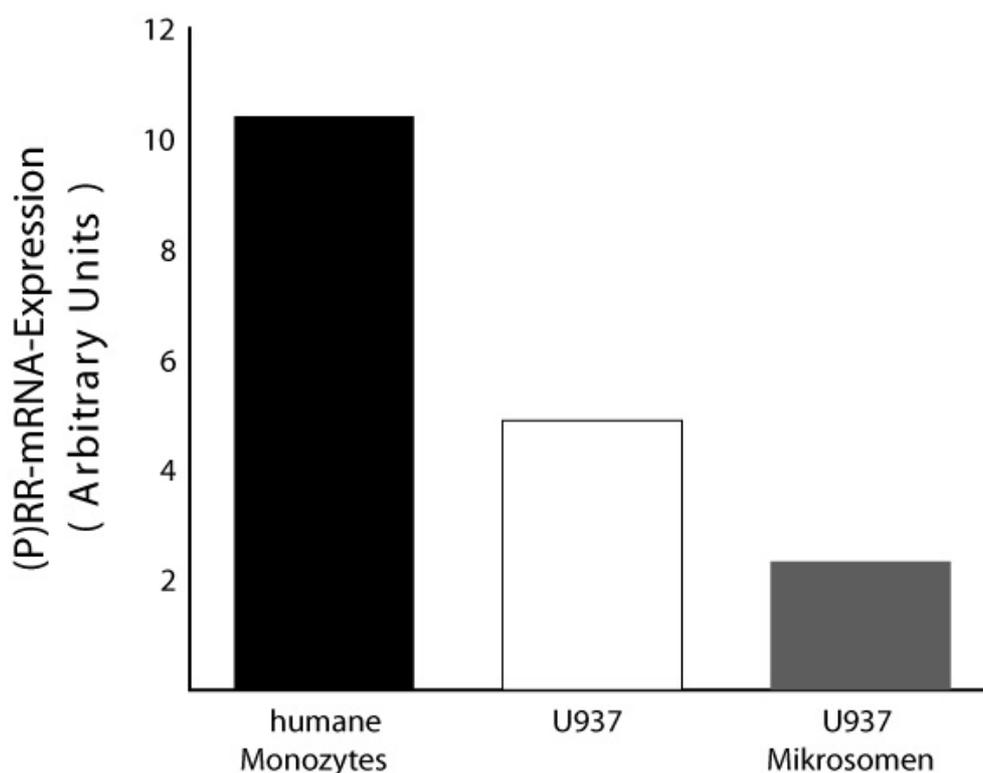


Abbildung 16: mRNA-Expression des h(P)RR

Expressionsvergleich in humanen Monozyten, in U937-Zellen und in den Mikrosomen der U937-Zellen; In humanen Monozyten ist die mRNA-Expression für h(P)RR doppelt so hoch wie in U937-Zellen. In der Mikrosomenfraktion der U937-Zellen kann die Hälfte der mRNA-Gesamtexpression von h(P)RR in U937-Zellen nachgewiesen werden.

Beim Vergleich des mRNA-Expressionsniveaus in U937-Zellen und CASMC ist ersichtlich, dass der (P)RR in beiden Zelltypen gut exprimiert wird. Die Expression in U937-Zellen ist allerdings höher als in CASMC (Abbildung 17).

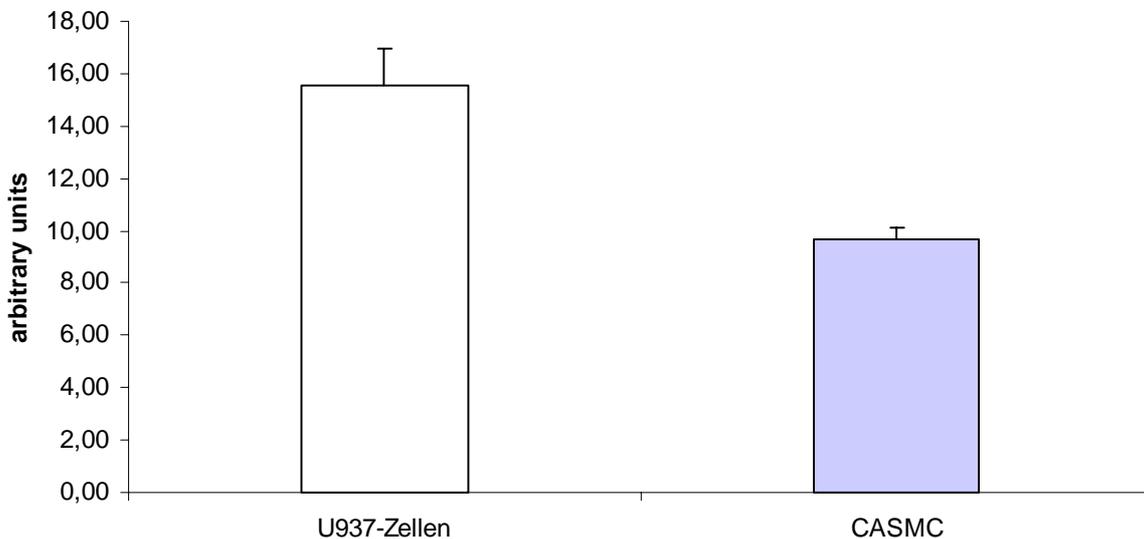


Abbildung 17: mRNA-Expression des h(P)RR in U937-Zellen und CASMC

In beiden Zelltypen ist h(P)RR auf mRNA-Ebene gut exprimiert. In U937-Zellen ist die mRNA-Expression des h(P)RR höher als in CASMC. Die Werte sind normalisiert auf hGAPDH. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

7.1.2 Die Expression des h(P)RR nach Stimulation mit Renin oder Prorenin

Es soll untersucht werden, ob eine Stimulation der U937-Zellen oder CASMC mit Renin oder Prorenin eine Veränderung der mRNA-Expressionshöhe des (P)RR bewirkt. Um Angiotensin II-vermittelte Wirkungen auszuschließen, werden die Zellen jeweils 30 Minuten mit AT1R-Blocker (Losartan) und AT2R-Blocker (PD123319) vorinkubiert. Danach werden die Zellen mit Renin oder Prorenin stimuliert und 24 Stunden später geerntet. Sowohl für U937-Zellen als auch für CASMC ergibt sich kein mRNA-Expressionsunterschied des h(P)RR nach Stimulation der Zellen mit Renin oder Prorenin gegenüber nicht stimulierten Zellen (Abbildung 18 und 19).

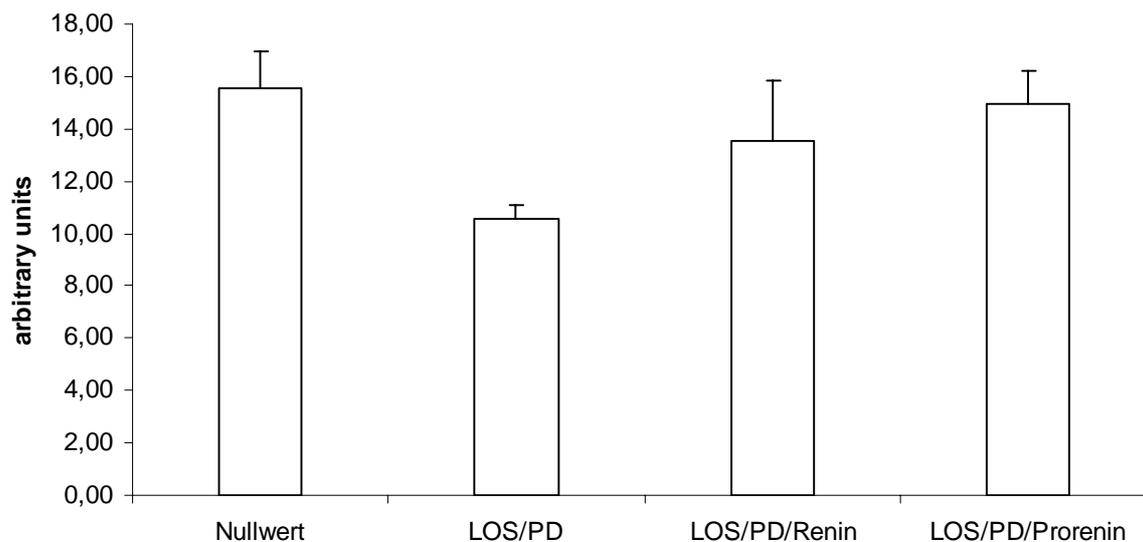


Abbildung 18: Einfluß von (Pro)renin auf h(P)RR-mRNA-Expression in U937-Zellen

Die Zellen werden für 30 Minuten mit Losartan (10 μ M) und PD123319 (10 μ M) vorinkubiert und dann 24 Stunden mit Renin (10nM) oder Prorenin (2nM) stimuliert. Diese Stimulationen ändern das h(P)RR-mRNA-Expressionsniveau nicht. Die Werte sind normalisiert auf hGAPDH. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

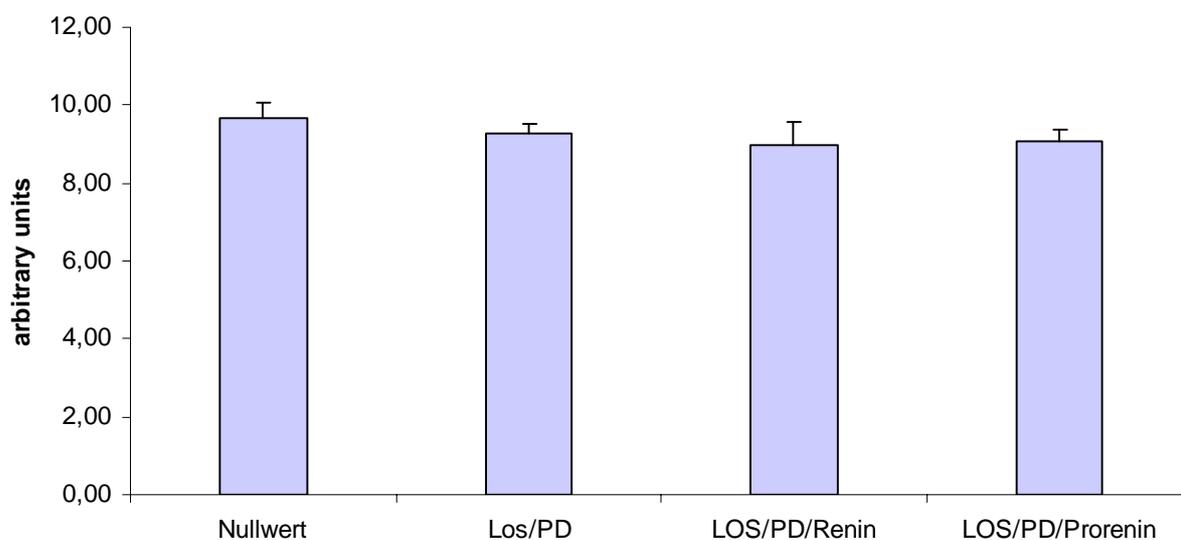


Abbildung 19: Einfluß von (Pro)renin auf h(P)RR-mRNA-Expression in CASMC

Die Zellen werden für 30 Minuten mit Losartan (10 μ M) und PD123319 (10 μ M) vorinkubiert und dann 24 Stunden mit Renin (10nM) oder Prorenin (2nM) stimuliert. Diese Stimulationen ändern das h(P)RR-mRNA-Expressionsniveau nicht. Die Werte sind normalisiert auf hGAPDH. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

7.1.3 Lokalisation des h(P)RR in U937-Zellen

Mittels Durchflusszytometrie wird die Lokalisation des h(P)RR auf und in U937-Zellen und in primären Monozyten untersucht. (P)RR-Proteinexpression kann in permeabilisierten humanen Monozyten nachgewiesen werden (Abbildung 20). Eine geringe (P)RR-Proteinexpression wird auf der Oberfläche von U937-Zellen ohne vorhergehende Permeabilisierung detektiert (Abbildung 21). Eine höhere Expression wird wiederum in permeabilisierten U937-Zellen detektiert (Abbildung 22). Diese Ergebnisse zeigen, dass (P)RR im Falle von U937-Zellen hauptsächlich intrazellulär und ein wesentlich kleinerer Anteil auf der Zelloberfläche gelegen ist. Die genaue Lokalisation von (P)RR in der Zelle ist unbekannt.

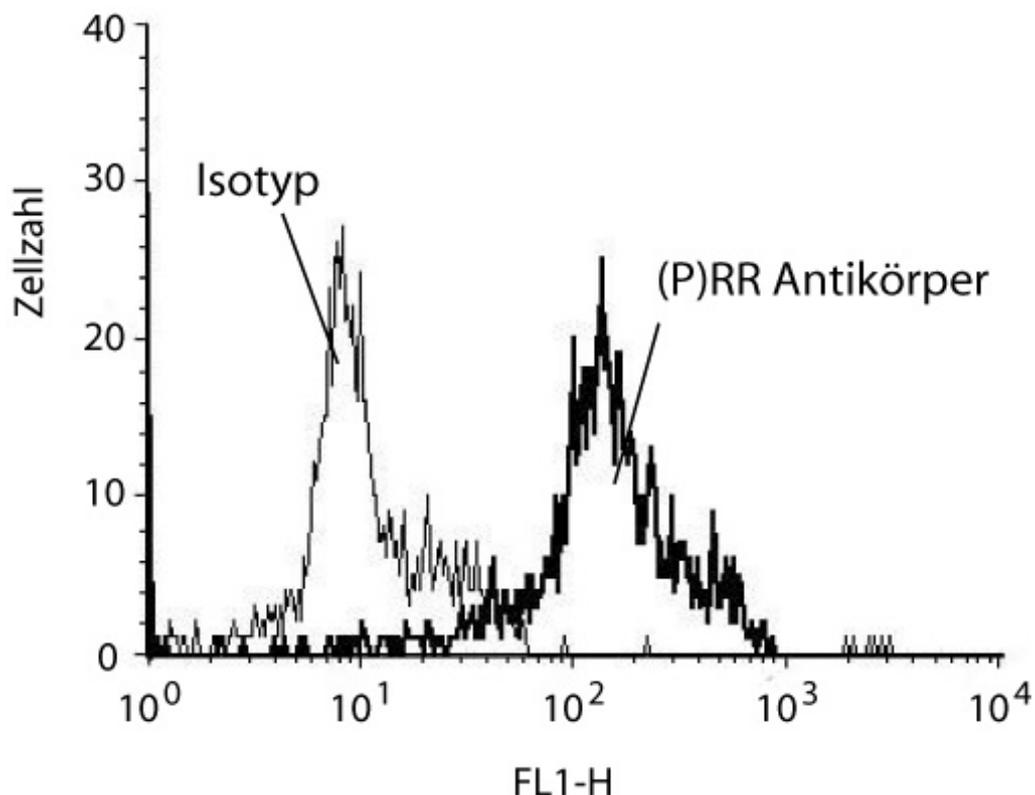


Abbildung 20: Durchflußzytometrieanalysen in permeabilisierten humanen Monozyten

Mittels Durchflußzytometrie in permeabilisierten humanen Monozyten wird untersucht, ob h(P)RR-Protein in diesen Zellen exprimiert wird. Dazu werden die Monozyten mit einer Saponin-haltigen Lösung permeabilisiert, danach entweder mit anti-(P)RR-Antikörper oder Präimmunsereum als Isotypkontrolle inkubiert und im Durchflußzytometer die Fluoreszenz gemessen. Ein deutlicher Shift in der Fluoreszenz der mit anti-(P)RR-Antikörper inkubierten Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle zeigt, dass viel h(P)RR-Protein in den humanen Monozyten exprimiert wird.

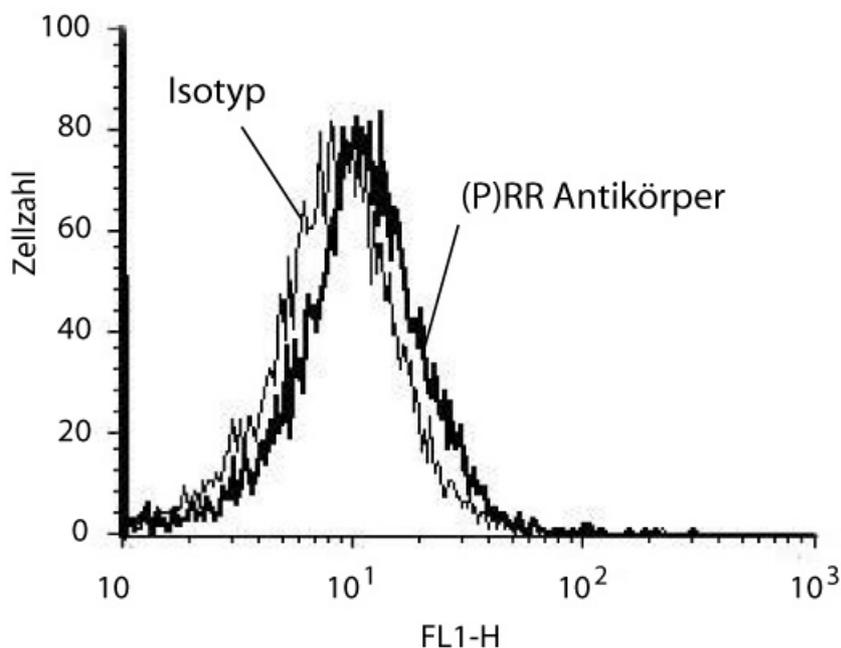


Abbildung 21: Durchflußzytometrieanalyse auf U937-Zellen

Auf U937-Zellen wird untersucht, ob h(P)RR-Protein auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dazu werden die Zellen ohne vorhergehende Permeabilisierung entweder mit anti-(P)RR-Antikörper oder Präimmunsereum inkubiert und anschließend die Fluoreszenz im Durchflußzytometer gemessen. Ein kleiner Shift in der Fluoreszenz der mit anti-(P)RR-Antikörper inkubierten Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle zeigt, dass nur wenig h(P)RR-Protein auf der Zelloberfläche von U937-Zellen exprimiert wird.

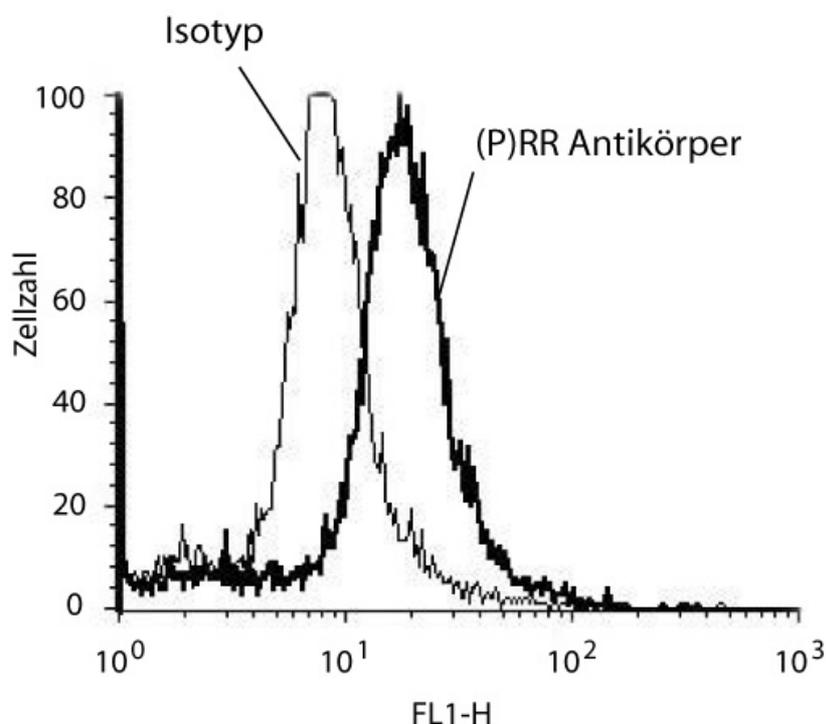


Abbildung 22: Durchflußzytometrieanalyse in permeabilisierten U937-Zellen

U937-Zellen werden mit einer Saponin-haltigen Lösung permeabilisiert, dann entweder mit anti-(P)RR-Antikörper oder Präimmunsereum inkubiert und die Fluoreszenz im Durchflußzytometer gemessen. Ein deutlicher Shift in der Fluoreszenz der mit anti-(P)RR-Antikörper inkubierten Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle zeigt, dass h(P)RR-Protein in U937-Zellen gut exprimiert wird. Aus dem Vergleich mit Abbildung 21 kann man ableiten, dass mehr h(P)RR-Protein in als auf U937-Zellen exprimiert wird.

7.1.4 (Pro)renin-induzierte ERK-Signaltransduktion in U937-Zellen

Im Folgenden werden die Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen in U937-Zellen untersucht. Um alle Angiotensin II-vermittelte Signalwirkungen auszuschließen, werden die Zellen vor jeder Renin- oder Proreninstimulation mit AT1R-Blocker Losartan (10 μ M) und mit AT2R-Blocker PD123319 (10 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert. Zunächst wird mit Hilfe eines Zeitverlaufs ermittelt, wann Renin (10 nM) oder Prorenin (2nM) in U937-Zellen eine ERK-Phosphorylierung induzieren. Humanes rekombinantes Renin induziert eine ERK-Phosphorylierung beginnend mit 15 Minuten und lang anhaltend bis zu 60 Minuten. (Abbildung 23a). Eine Messung der pERK-Aktivität mittels p44/42 MAP Kinase Assay bestätigt diese Ergebnisse. (Abbildung 23b). Aufgrund dieses Zeitverlaufs verwenden wir als Stimulationszeit für Reninstimulationen 45 Minuten in U937-Zellen.

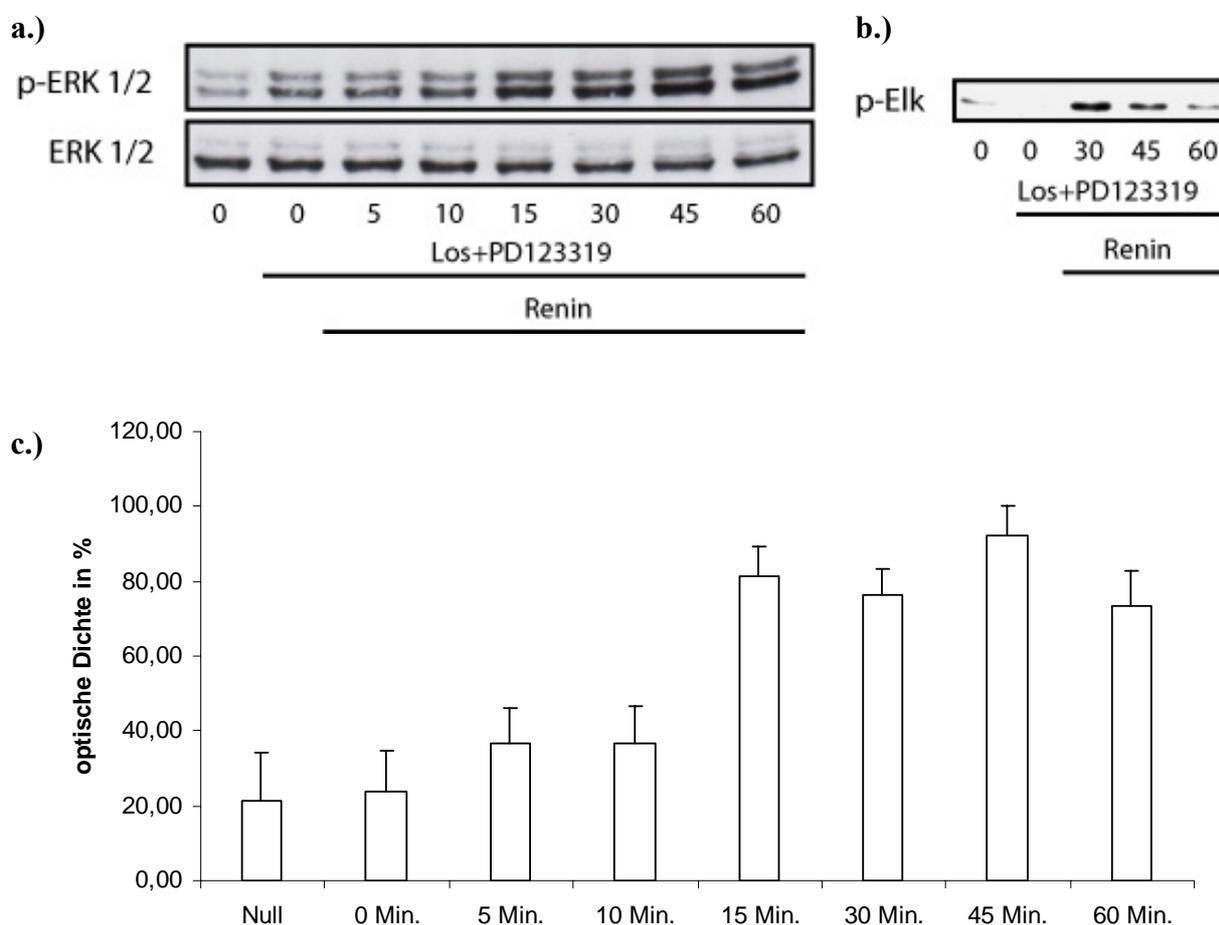


Abbildung 23: Renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen

Renin (10 nM) induziert in U937-Zellen eine ERK-Phosphorylierung nach 15 Minuten und lang anhaltend bis zu 60 Minuten. Nichtphosphoryliertes ERK dient als Ladungskontrolle (a.). Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors ELK in U937-Zellen nach der Stimulation mit Renin zeigt, dass pERK aktiv ist (b.). Eine entsprechende Quantifizierung und statistische Auswertung der Renin-induzierten ERK-Phosphorylierung beweist, dass nach 15, 30, 45 und 60 Minuten Stimulationen mit Renin signifikant erhöhte ERK-Phosphorylierungen im Vergleich zu früheren Zeitpunkten auftreten ($p < 0,05$) (c.).

Prorenin induziert eine ERK-Phosphorylierung in einem entsprechenden Zeitverlauf von 30 bis 45 Minuten. (Abbildung 24a). Daher wird für weitere Stimulationsexperimente mit Prorenin in U937-Zellen eine Stimulationszeit von 45 Minuten verwendet.

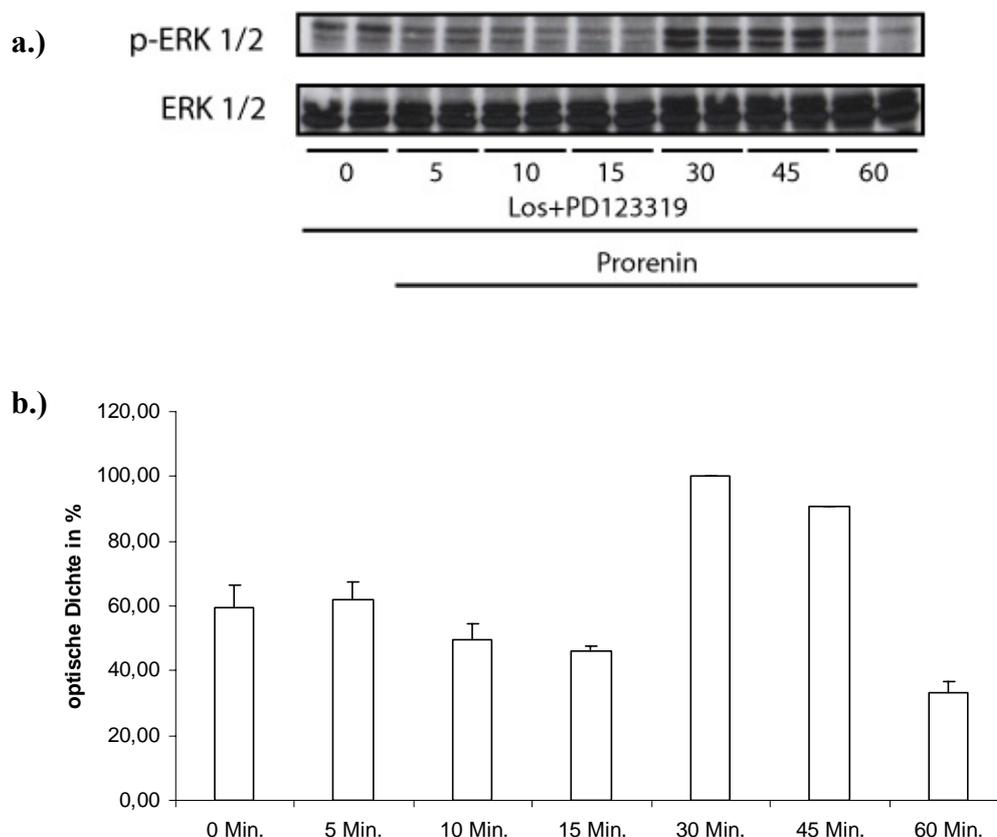


Abbildung 24: Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen

Prorenin (2 nM) induziert in U937-Zellen eine ERK-Phosphorylierung nach 30 Minuten bis zu 45 Minuten. Nichtphosphoryliertes ERK dient als Ladungskontrolle (a.). Eine entsprechende Quantifizierung und statistische Auswertung der Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung beweist, dass nach 30 und 45 Minuten Stimulationen mit Prorenin signifikant erhöhte ERK-Phosphorylierungen im Vergleich zu den anderen untersuchten Zeitpunkten auftreten ($p < 0,05$) (b.).

7.1.5 Einfluß von EGF-Rezeptor auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen

Angiotensin II-vermittelte ERK-Phosphorylierung ist bedingt durch eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (EGFR). So stellt sich hier als nächstes die Frage, ob auch Renin- und Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierungen über EGFR vermittelt werden. Im Gegensatz zur Angiotensin II-induzierten EGFR-Phosphorylierung in glatten Muskelzellen, induzieren Renin oder Prorenin keine EGFR-Phosphorylierung in U937-Zellen (Abbildung 25). Nichtphosphorylierter EGFR dient im Western blot als Ladungskontrolle. Renin-stimulierte Extrakte der gleichen Proben zeigen bei nichtphosphoryliertem EGFR aktiviertes ERK (Abbildung 25 a).

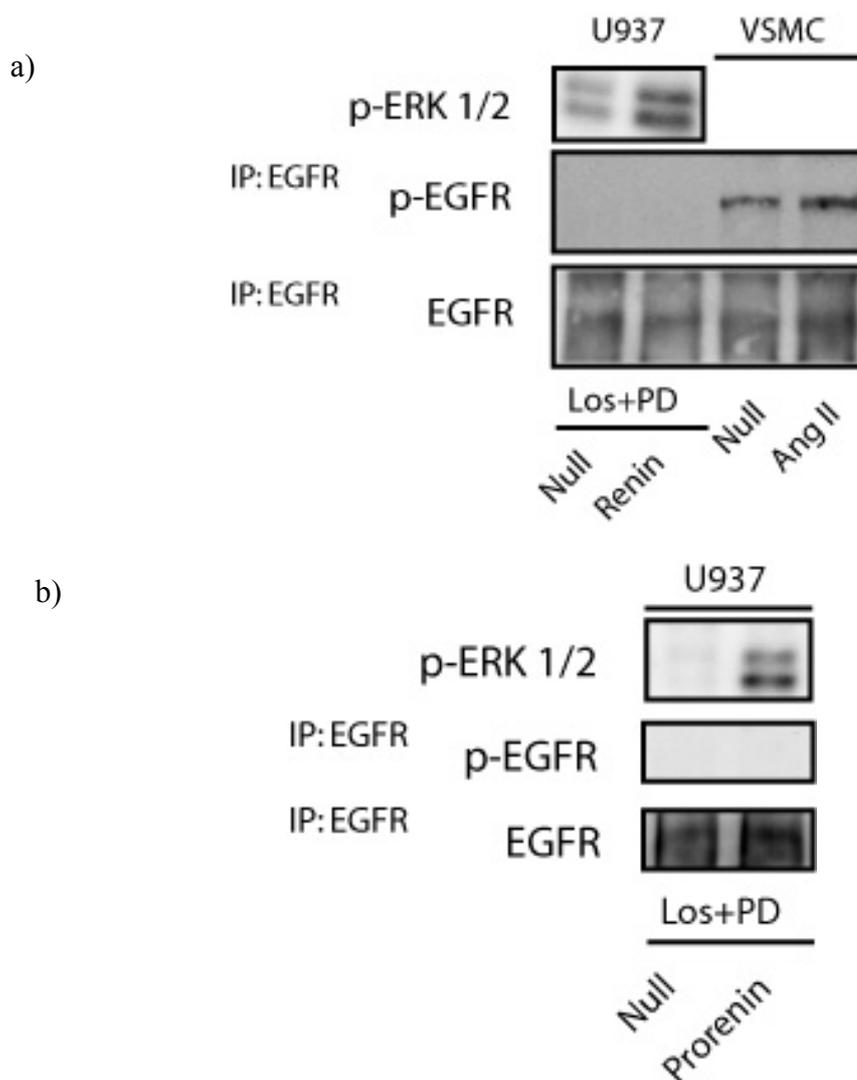


Abbildung 25: Experimente zum EGF-Rezeptor in U937-Zellen

a.) EGF-Rezeptor-Antikörper wird verwendet für die Immunopräzipitation in unbehandelten und Renin (10 nM, 45 Minuten)-behandelten U937-Zellen und in unbehandelten und Angiotensin II (100 nM, 2 Minuten)-behandelten vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC). Der EGF-Rezeptor-Western blot (unten) dient als Ladungskontrolle. Der mittlere Blot zeigt kein phospho-EGF (p-EGF)-Rezeptor-Signal in U937-Zellen nach Reninstimulation und verstärktes Signal in Angiotensin II-behandelten VSMC. Der obere Blot zeigt die gesteigerte ERK-Phosphorylierung in Renin-behandelten U937-Zellen vom gleichen Experiment. In b.) sind entsprechende Ergebnisse nach der Stimulation mit Prorenin dargestellt.

7.1.6 Einfluß eines PKC $_{\alpha\beta}$ -Blockers auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen

Als nächstes soll untersucht werden, ob die Renin- oder Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung von PKC $_{\alpha\beta}$ abhängig ist. Dazu werden die U937-Zellen mit dem PKC $_{\alpha\beta}$ -Inhibitor Gö6976 (10 nM) für 30 Minuten vorinkubiert und dann die Zellen entsprechend mit Renin oder Prorenin für 45 Minuten stimuliert. Gö6976 verhindert weder Renin- noch Prorenin-vermittelte ERK-Phosphorylierung (Abbildung 26 a) Daraus kann man schlussfolgern, dass auch PKC $_{\alpha\beta}$ in den Renin- und Prorenin vermittelten ERK-Phosphorylierungen in U937-Zellen keine Rolle spielt.

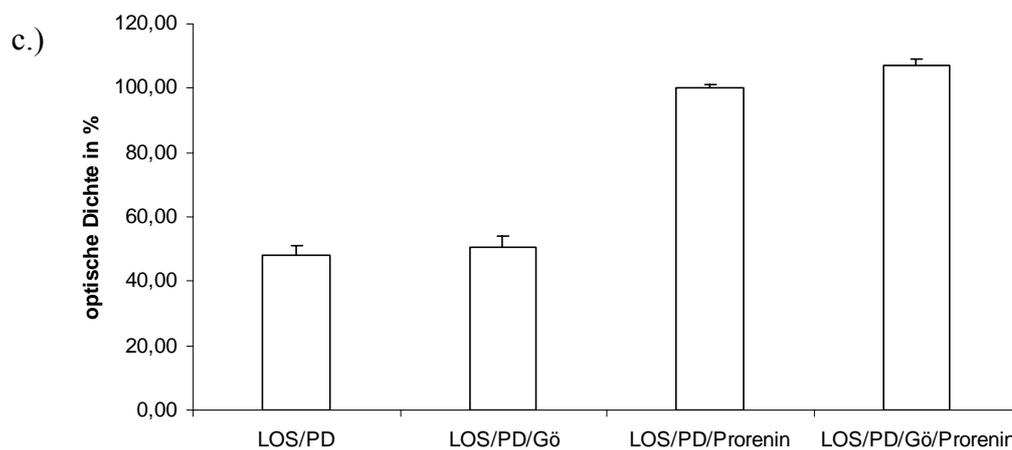
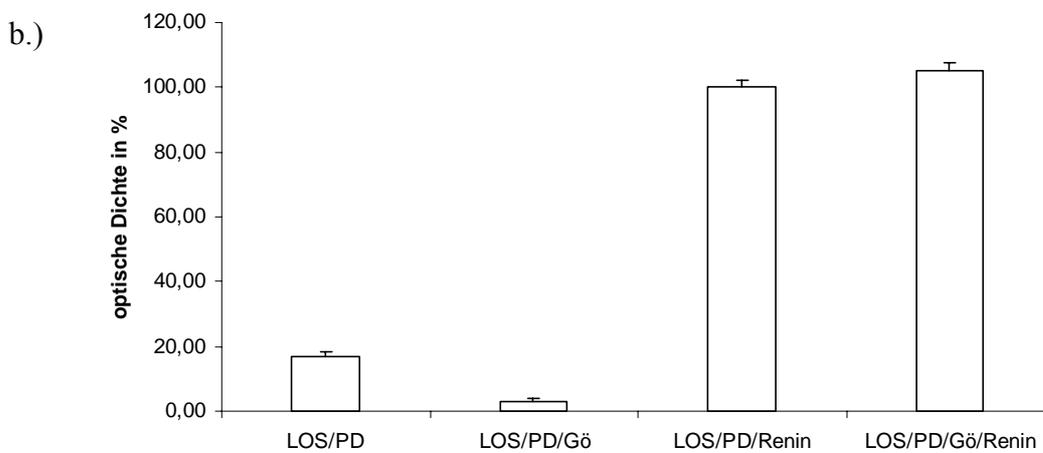
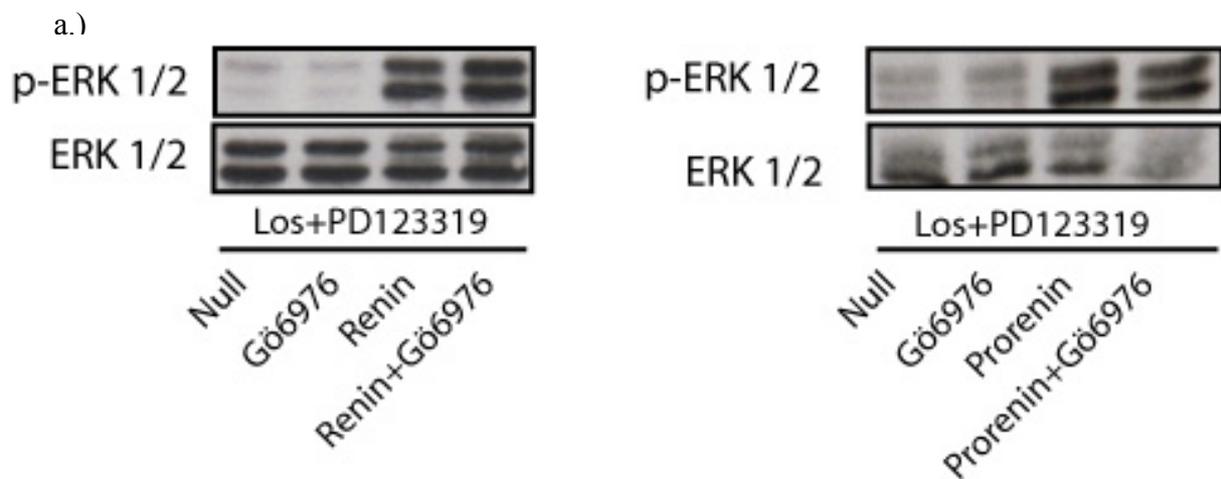


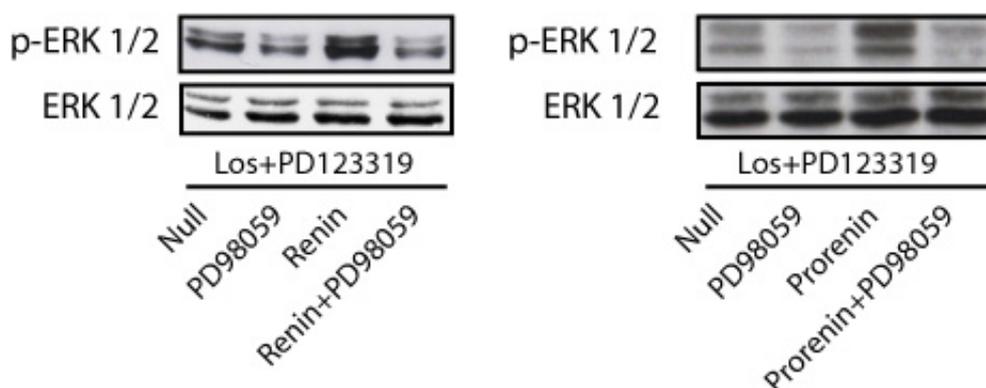
Abbildung 26: Experimente zur $PKC_{\alpha/\beta}$ in U937-Zellen

Die Abbildung a.) zeigt die Wirkung eines $PKC_{\alpha/\beta}$ -Inhibitors (Gö6976, 10 nM) auf Renin (links, 10 nM)- und Prorenin (rechts, 2 nM)-induzierte ERK-Phosphorylierungen (oben) mit ERK als Ladungskontrolle (unten). Bei der Quantifizierung dieser Ergebnisse wird die gemessene optische Dichte der Renin-(b.) oder Prorenin-(c.)induzierten ERK-Phosphorylierung auf 100 % gesetzt und dazu der prozentuale Anteil der ERK-Phosphorylierung der mit Gö6976-vorinkubierten Zellen und der Kontrollen dargestellt. Es wird deutlich, dass dieser $PKC_{\alpha/\beta}$ -Inhibitor die Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen nicht beeinflusst.

7.1.7 Einfluß eines MEK-Blockers auf die (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen

MEK ist eine Kinase, die der MAPK ERK direkt vorgeschaltet ist. Bei Vorinkubation der U937-Zellen mit einem MEK-Inhibitor PD98059 (100 nM) für 30 Minuten und anschließender Stimulation mit Renin oder Prorenin wird die Renin- oder Prorenin vermittelte ERK-Phosphorylierung signifikant ($p < 0,05$) vermindert. (Abbildung 27 a-c)

a.)



b.)

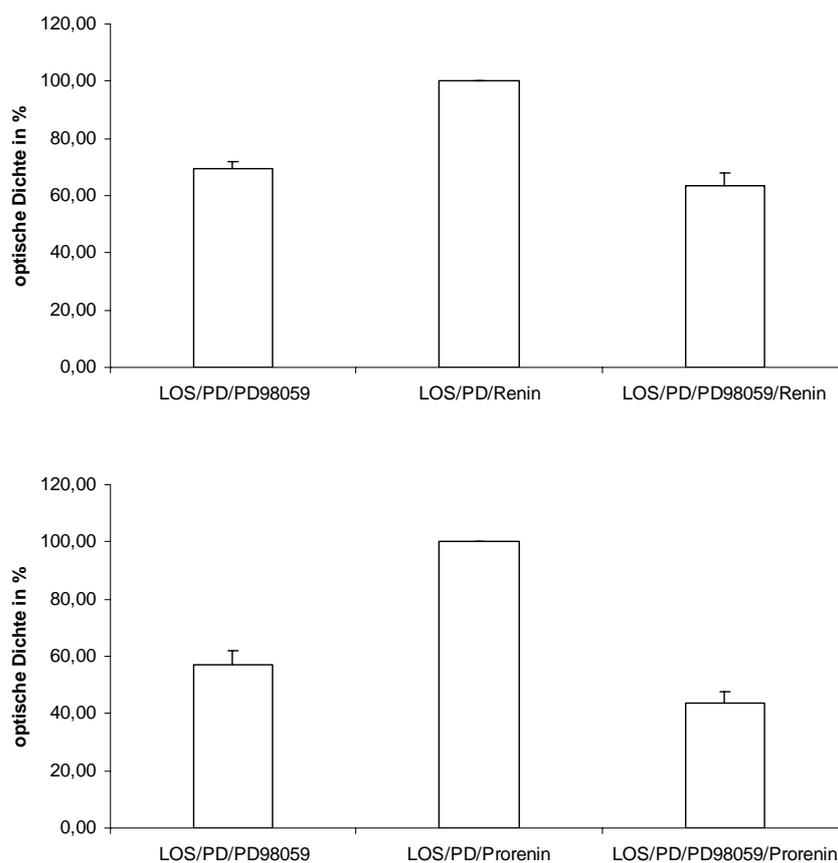


Abbildung 27: Experimente zu MEK in U937-Zellen

Die Abbildung a.) zeigt die Wirkung eines MEK-Inhibitors (PD98059, 100 nM) auf Renin (links, 10 nM)- und Prorenin (rechts, 2 nM)-induzierte ERK-Phosphorylierungen (oben) mit ERK als Ladungskontrolle (unten). Die Quantifizierung und statistische Auswertung (b.) dieser Ergebnisse zeigt, dass die Vorinkubationen der U937-Zellen mit PD98059 zu einer signifikanten Abschwächung der Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung führen ($p < 0,05$).

7.1.8 Einfluß von Mannose-6-phosphat-Rezeptor auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen

Es ist in früheren Arbeiten gezeigt worden, dass Renin durch Bindung an den Mannose-6-phosphat-Rezeptor (M6PR) auf neonatalen Rattenkardiomyozyten internalisiert und degradiert wird (Clearance-Rezeptor). In dieser Arbeit wird untersucht, ob dieser M6PR an der Renin-vermittelten Signaltransduktion beteiligt ist. An den M6PR kann Renin nur binden, wenn es einen entsprechenden Mannose-6-phosphat-Rest trägt, also glykosyliert ist.

Hier wird für ein entsprechendes Experiment deglykosyliertes, also an M6PR nicht mehr bindungsfähiges Renin zur Stimulation von U937-Zellen verwendet. Deglykosyliertes Renin kann ebenfalls eine ERK-Phosphorylierung induzieren. Daraus lässt sich ableiten, dass Renin-vermittelte ERK-Phosphorylierung unabhängig von M6PR ist. (Abbildung. 28)

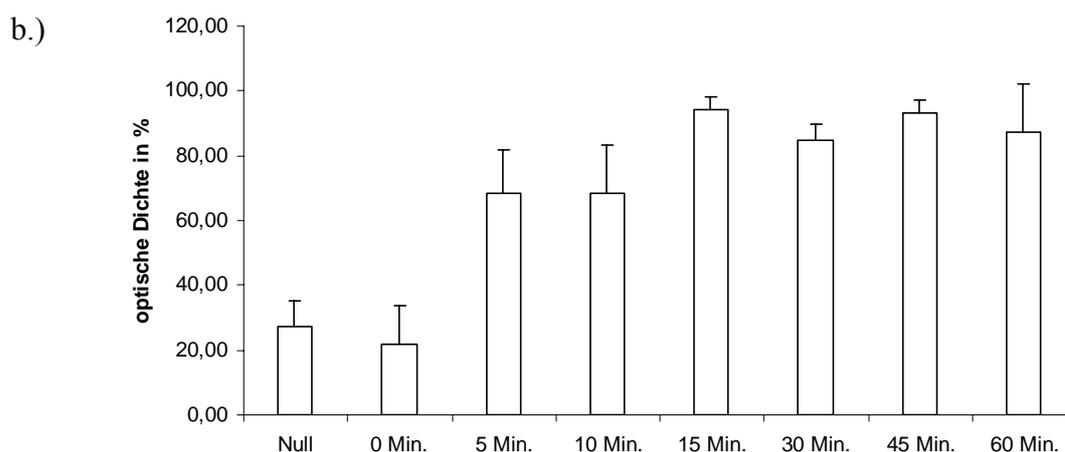
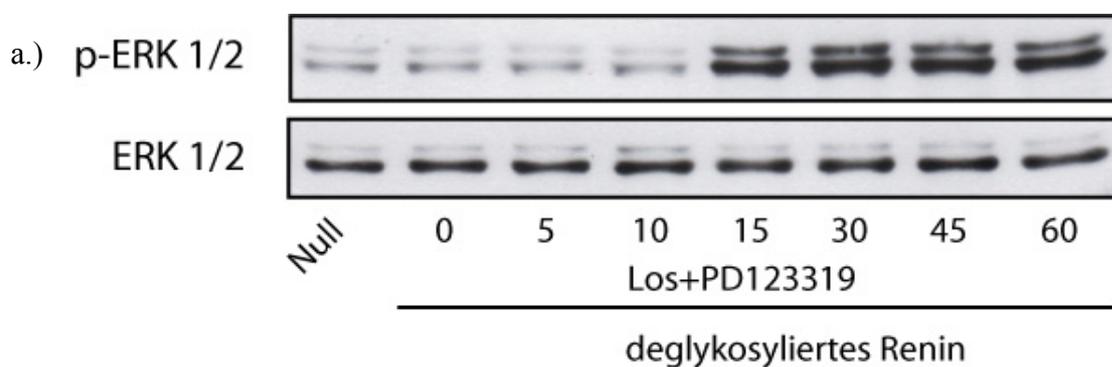


Abbildung 28: Experimente zum M6PR in U937-Zellen

a.) Stimulationen der U937-Zellen mit deglykosyliertem Renin führen nach 15 Minuten zur ERK-Phosphorylierung. Diese hält bis zu 60 Minuten an. ERK dient als Ladungskontrolle (unten). b.) Eine entsprechende Quantifizierung und statistische Auswertung dieser Ergebnisse beweist, dass Stimulationen mit deglykosyliertem Renin nach 15, 30, 45 und 60 Minuten zu einer signifikant gesteigerten ERK-Phosphorylierung im Vergleich zu früheren Zeitpunkten führen ($p < 0,05$).

7.1.9 Einfluß von Aliskiren auf (Pro)renin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in U937-Zellen

Bisher ist nicht bekannt, ob der humane Renininhibitor Aliskiren auch die Renin- oder Prorenin- induzierte ERK-Phosphorylierung beeinflussen kann. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass Aliskiren die Renin (Abbildung 29a (links))- und Prorenin (Abbildung 29a (rechts))- induzierten ERK-Phosphorylierungen nicht beeinflusst. Das Ergebnis für die Reninstimulation wird wieder mit pElk-Aktivitätsmessung bestätigt (Abbildung. 29b).

a.)



b.)

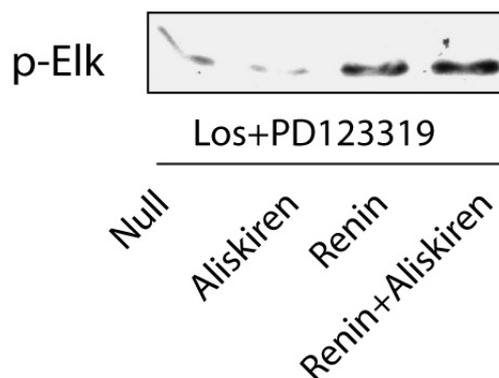


Abbildung 29: Experimente mit Aliskiren in U937-Zellen

Die Abbildung a.) zeigt die Wirkung von Aliskiren (10 μ M) auf Renin (10 nM, links)- und Prorenin (2 nM, rechts)-induzierte ERK-Phosphorylierungen (oben) mit ERK als Ladungskontrolle (unten). Weder Renin- noch Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierungen werden durch Vorinkubation der Zellen mit Aliskiren abgeschwächt. Die Abbildung b.) zeigt, dass die Stimulation der U937-Zellen mit Renin (10 nM) zur ELK-Phosphorylierung führt und dass die Vorinkubation der Zellen mit Aliskiren (10 μ M) und die anschließende Stimulation mit Renin (10 nM) die Renin-induzierte ELK-Phosphorylierung nicht abschwächt.

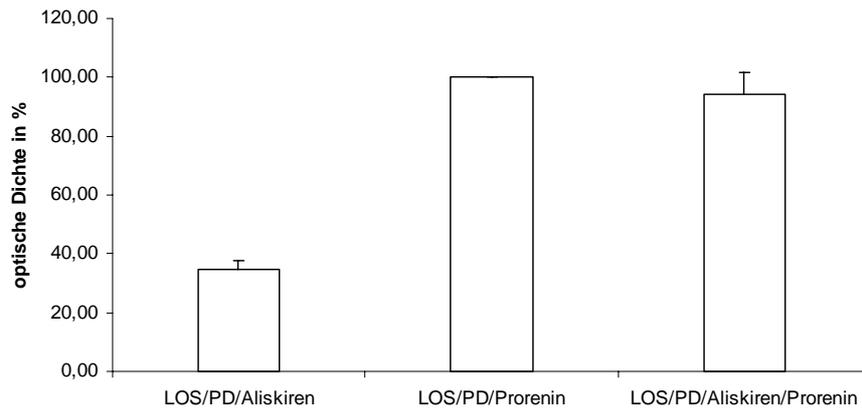


Abbildung 30: Quantifizierungen der Experimente mit Aliskiren in U937-Zellen

Eine Quantifizierung und statistische Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 29a beweist, dass Vorinkubation der U937-Zellen mit Aliskiren und anschließende Stimulation mit Prorenin keine signifikante Abschwächung der Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung bewirkt ($p > 0,05$).

7.1.10 Einfluß von HRP auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in U937-Zellen

In den nächsten Experimenten wird der Einfluß des (P)RR-Blockers HRP auf die Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen in U937-Zellen untersucht.

Zunächst wird mittels Durchflußzytometrie gezeigt, dass FITC-markiertes HRP (10^{-7} - 10^{-8} M) konzentrationsabhängig an U937-Zellen bindet (Abbildung 31a). Ein 10-facher Überschuss von nichtmarkiertem HRP (10^{-7} M) bewirkt eine kompetitive Verdrängung von FITC-markiertem HRP (10^{-8} M) von seinen Bindungsstellen an U937-Zellen (Abbildung 31b). Dann aber werden durchflusszytometrische Messungen mit FITC-HRP (10^{-8} M) in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durchgeführt, die die Transmembrandomäne des (P)RR nicht tragen. Diese Zellen sollten FITC-markiertes HRP daher nicht binden. Überraschenderweise erfolgt aber eine Bindung von FITC-markiertem HRP an diese Zellen im Durchflusszytometerversuch (Abbildung 32). Dieser Versuch zeigt, dass HRP nicht an den (P)RR bindet, sondern an einen bisher unbekanntem Ort auf U937-Zellen.

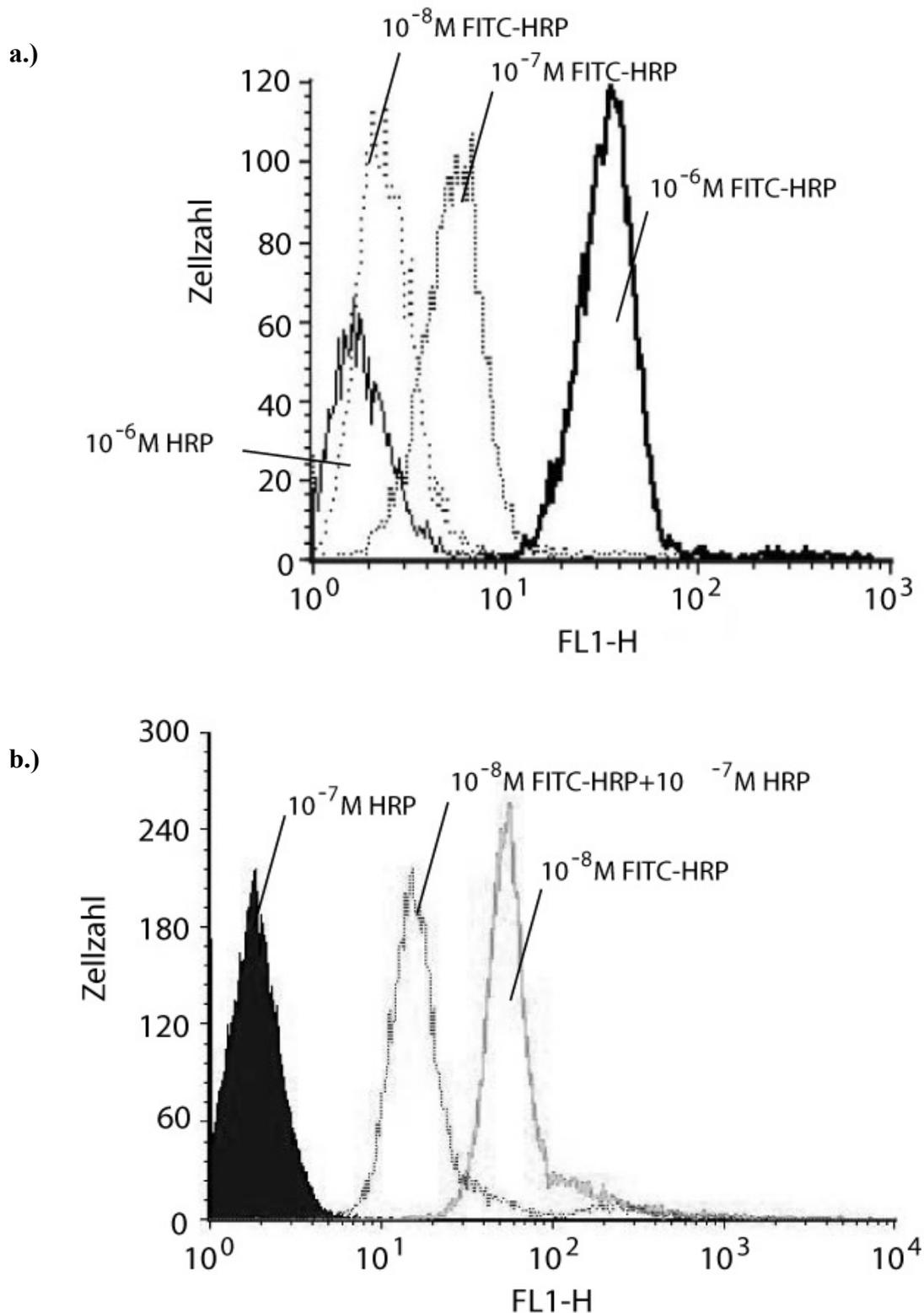


Abbildung 31: Durchflußzytometerexperimente mit HRP in U937-Zellen

a.) Bei Vorinkubation der U937-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von FITC-HRP (10^{-7} - 10^{-8} M) kann im Durchflußzytometer eine mit der Konzentration erhöhte Fluoreszenz gemessen werden. Daraus kann man ableiten, dass FITC-HRP konzentrationsabhängig an U937-Zellen bindet. Als Kontrollen dienen U937-Zellen, die mit nichtgelabeltem HRP (10^{-6} M) vorbehandelt werden. b.) Eine Vorinkubation der U937-Zellen mit FITC-HRP (10^{-8} M) und anschließende Behandlung mit einem 10-fachen Überschuß von ungelabeltem HRP (10^{-7} M) führt zu einem geringeren Shift in der Fluoreszenz als bei Zellen, die nur mit FITC-HRP (10^{-8} M) gelabelt werden. Daraus kann man ableiten, dass die Bindung von FITC-HRP an U937-Zellen kompetitiv ist. Als Kontrollen dienen U937-Zellen, die mit nichtgelabeltem HRP (10^{-7} M) vorbehandelt werden.

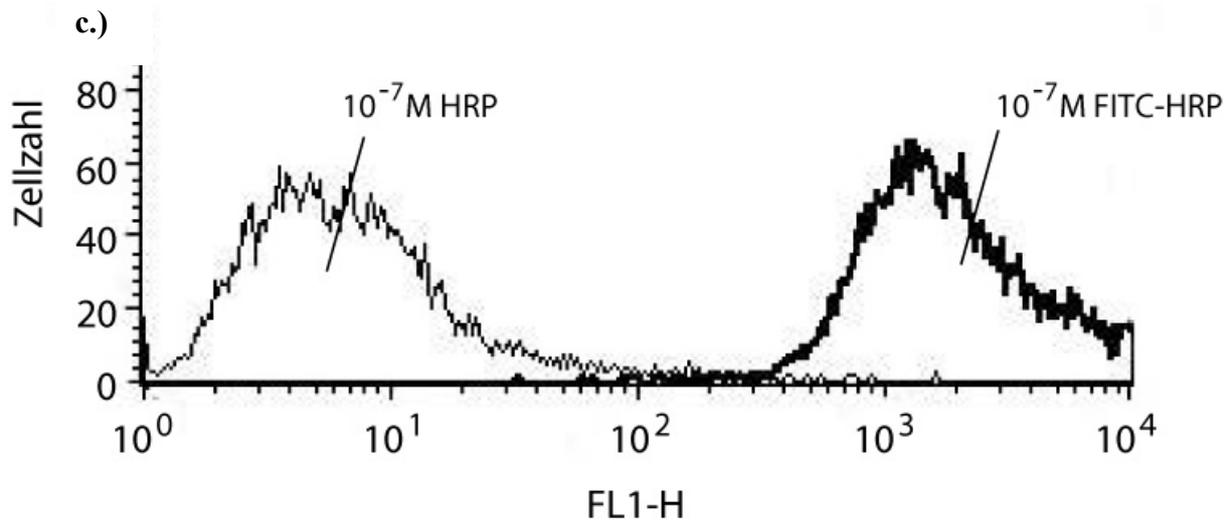


Abbildung 32: Durchflußzytomereperiment mit HRP in ES-Zellen

Diese Durchflußzytometeranalyse zeigt die Bindung von FITC-HRP (10^{-7} M) an embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die die Transmembrandomäne des (P)RR nicht tragen. Als Kontrollen dienen U937-Zellen, die mit nichtgelabeltem HRP (10^{-7} M) vorbehandelt werden.

In Western blot-Experimenten zeigt sich, dass bei einer Vorinkubation der U937-Zellen mit HRP für 30 Minuten und anschließende Stimulation mit Renin oder Prorenin die Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen unbeeinflusst bleiben (Abbildung 33).

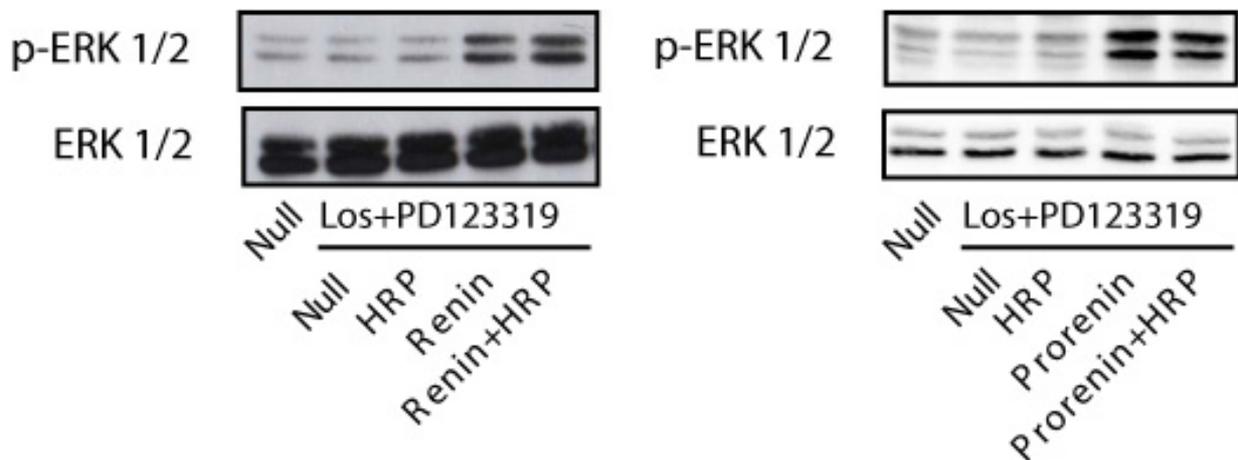


Abbildung 33 Einfluß von HRP auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierungen

Vorinkubation der U937-Zellen mit HRP ($1 \mu\text{M}$) für 30 Minuten und anschließende Stimulation mit Renin (10 nM ; links) oder Prorenin (2 nM ; rechts) für 45 Minuten führt zu keiner Abschwächung der Renin- oder Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung. Nichtphosphoryliertes ERK dient als Ladungskontrolle.

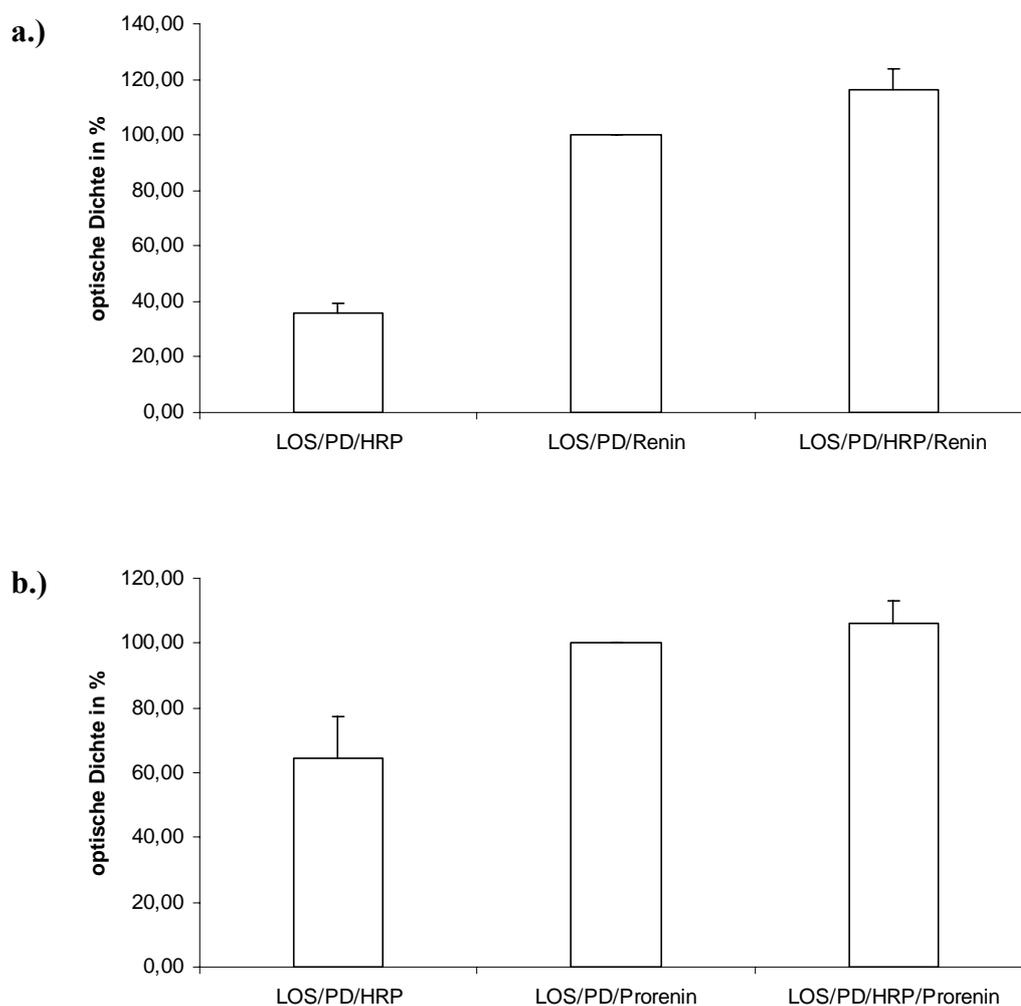


Abbildung 34: Quantifizierungen der Western blot-Experimente mit HRP in U937-Zellen

Eine Quantifizierung und statistische Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 33 beweist, dass die Vorinkubation der U937-Zellen mit HRP (1 μ M) und die anschließende Stimulation mit Renin (10 nM) (a.) oder Prorenin (2nM) (b.) keine signifikante Abschwächung der Renin oder Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung bewirkt ($p > 0,05$). Die optische Dichte der Renin-(a.) oder Prorenin-(b.)-induzierten ERK-Phosphorylierung wird auf 100 % gesetzt und der prozentuale Anteil der optischen Dichte nach jeweiliger Vorinkubation der Zellen mit HRP dazu berechnet.

7.1.11 ^{125}I -Renin- und ^{125}I -Proreninbindung an U937-Zellen

In radioaktiven Bindungsexperimenten werden U937-Zellen jeweils mit ^{125}I -Renin oder ^{125}I -Prorenin (0,1-0,2 nM) inkubiert, gewaschen und die Radioaktivität gemessen. Dieser Wert entspricht der Summe von spezifischer und unspezifischer Bindung von ^{125}I -Renin oder ^{125}I -Prorenin an U937-Zellen. Dann wird ein Überschuss von ungelabeltem Renin oder Prorenin inkubiert, gewaschen und wieder die Radioaktivität gemessen. Der in der 2. Messung erhaltene Wert entspricht unspezifisch, also nicht an (P)RR gebundenem ^{125}I Renin oder ^{125}I Prorenin an U937-Zellen. Durch Subtraktion des 2. Wertes vom 1. Wert erhält man die spezifische Bindung von ^{125}I -Renin oder ^{125}I -Prorenin an den (P)RR in U937-Zellen. Dieser Wert wird auf 100 % gesetzt und im Verhältnis dazu die spezifische Bindung in % bei Vorinkubation der Zellen mit Aliskiren (10 μM) oder HRP (1 μM) dargestellt (Abbildung 35). Auch diese Bindungsstudien zeigen, dass HRP und Aliskiren Renin- und Proreninbindung an den (P)RR nicht hemmen können.

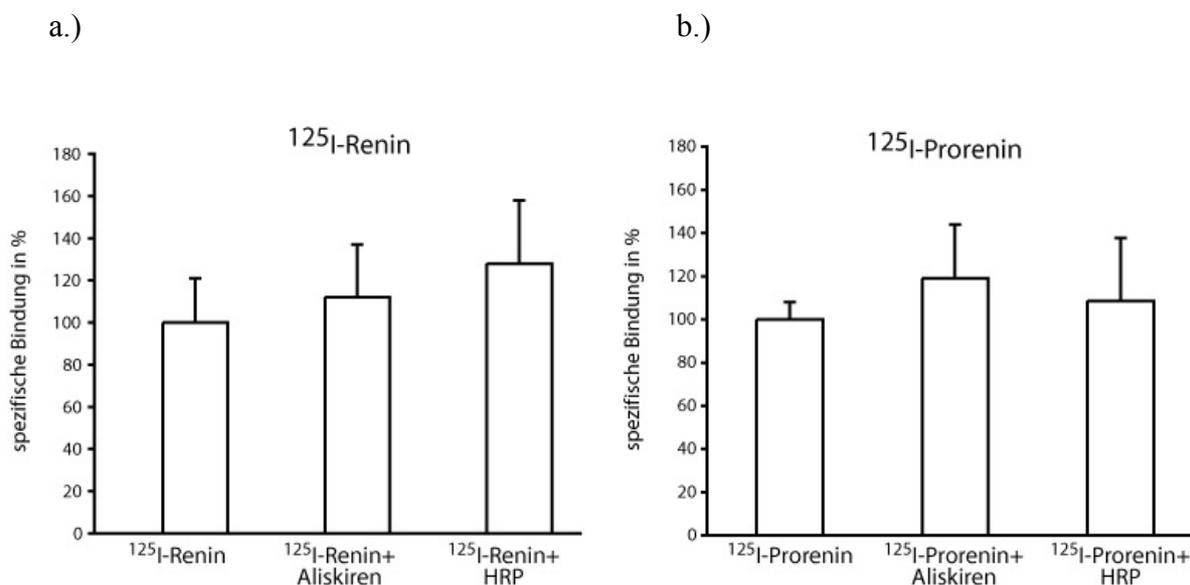


Abbildung 35: radioaktive Bindungsexperimente in U937-Zellen

Die Abbildungen zeigen die spezifische Bindung von ^{125}I -Renin (0,1-0,2 nM; a.) und ^{125}I -Prorenin (0,1-0,2 nM; b.) an den (P)RR in U937-Zellen. Die spezifische Bindung von ^{125}I -Renin oder ^{125}I -Prorenin wird errechnet aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und Bindung in Anwesenheit eines Überschusses des jeweils nicht gelabelten Renins oder Prorenins. Dieser Wert wird auf 100 % gesetzt. Der prozentuale Anteil dieser Bindung nach Vorinkubation der Zellen mit Aliskiren oder HRP wird errechnet. Weder Vorinkubation mit Aliskiren (10 μM) noch HRP (1 μM) beeinflussen die ^{125}I -Renin-(a.) und ^{125}I -Proreninbindung an U937-Zellen (b.).

7.1.12 (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in CASMC

Um eine über Angiotensin II-vermittelte Signaltransduktion auszuschließen, werden die CASMC vor jedem Stimulationsversuch 30 Minuten mit AT1R-Blocker Losartan (10 μ M) und mit AT2R-Blocker PD123319 (10 μ M) vorinkubiert. Im Zeitverlauf kann nachgewiesen werden, dass humanes rekombinantes Renin eine ERK-Phosphorylierung induziert. Diese beginnt schon nach 5 Minuten. Ein starkes Signal dauert dann bis zu 15 Minuten an. Danach sinkt die ERK-Aktivierung wieder auf Basalniveau. (Abbildung 36a). Aufgrund dieses Zeitverlaufs wird für folgende Stimulationen der CASMC mit Renin eine Stimulationszeit von 10 Minuten gewählt.

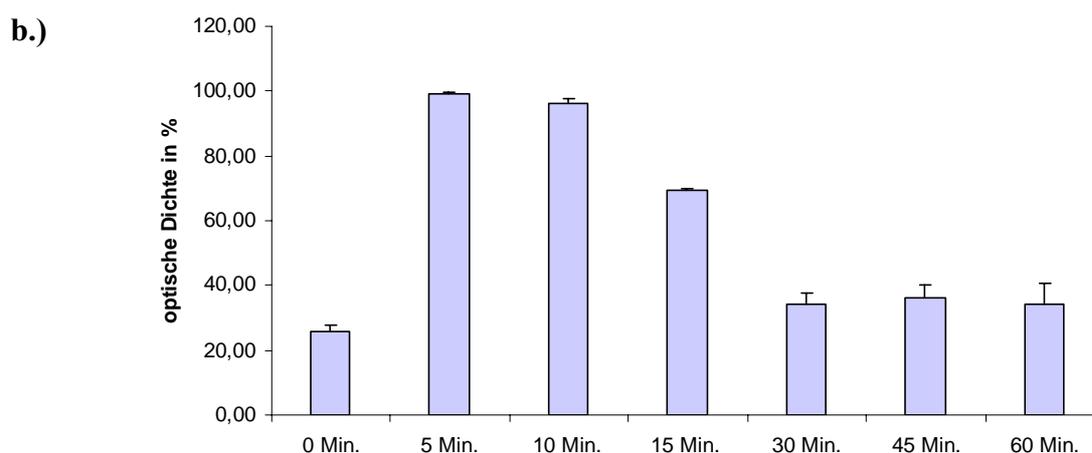
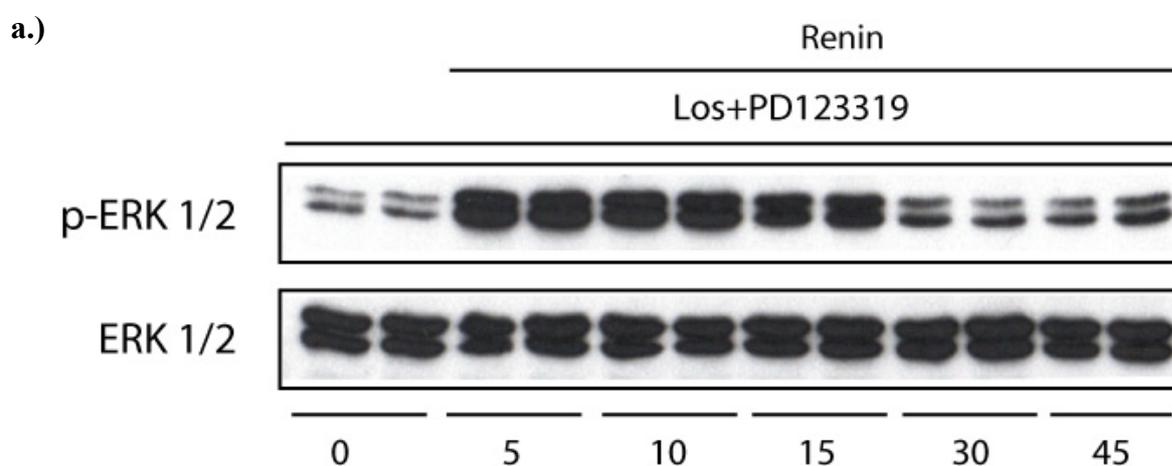


Abbildung 36: Renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in CASMC

a.) Stimulationen der humanen CASMC mit Renin (10 nM) führen nach 5 Minuten zur ERK-Phosphorylierung. Diese hält bis zu 15 Minuten an. ERK dient als Ladungskontrolle. b.) Für die Quantifizierung dieser Ergebnisse wird die optische Dichte nach 5 minütiger Stimulation mit Renin auf 100 % gesetzt und dazu der prozentuale Anteil der optischen Dichte der anderen Zeitpunkte berechnet. Die ERK-Phosphorylierung nach Stimulation mit Renin ist nach 5 und 10 Minuten am stärksten ausgeprägt.

Auch humanes rekombinantes Prorenin induziert eine ERK-Phosphorylierung in CASMC, die nach 5 Minuten beginnt und bis zur 15 minütigen Stimulation stark ausgeprägt ist. Danach nimmt das Signal wieder ab. (Abbildung 37). Aufgrund dieses Zeitverlaufs wird für folgende Stimulationen der CASMC mit Prorenin eine Stimulationszeit von 10 Minuten gewählt.

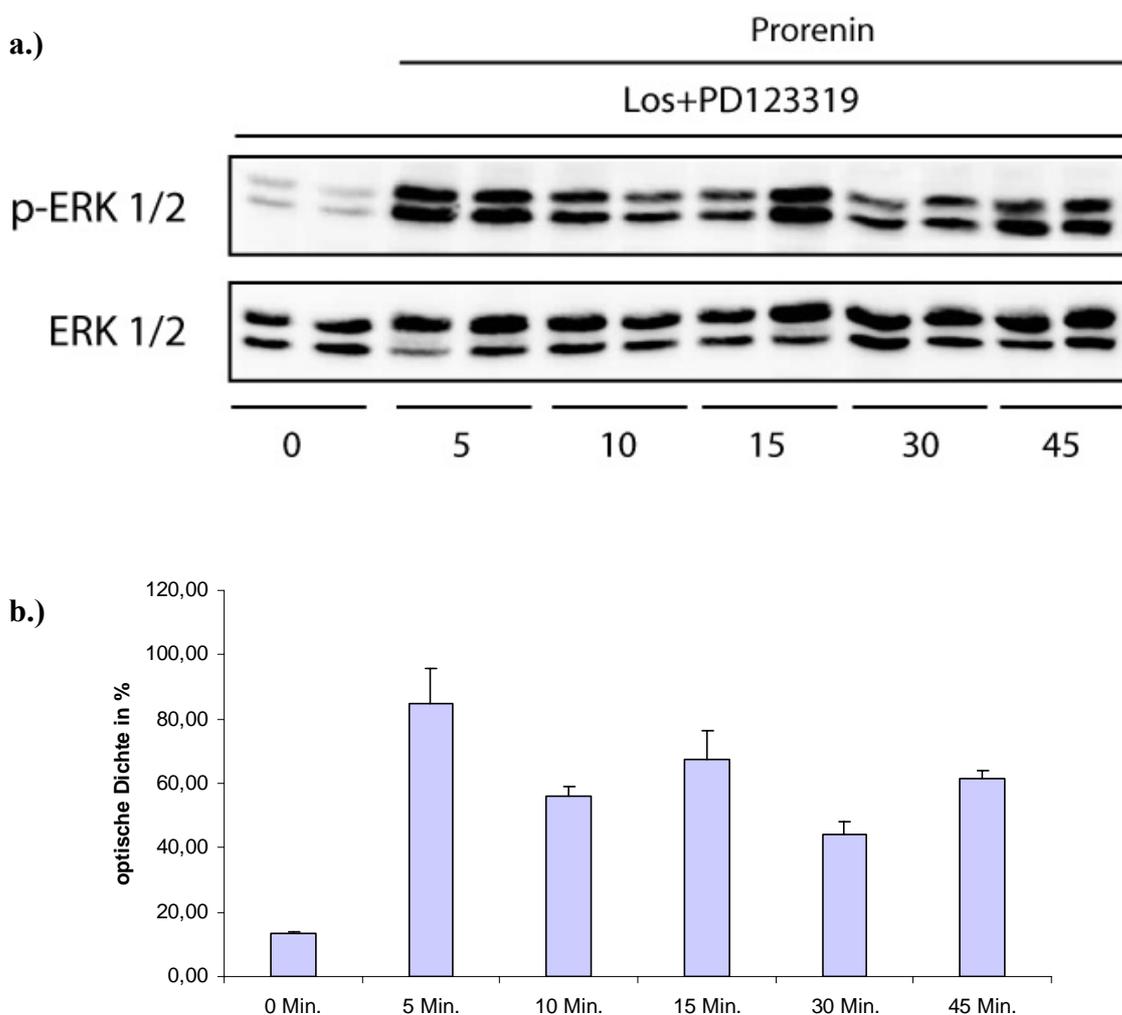


Abbildung 37: Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung in CASMC

a.) Stimulationen der humanen CASMC mit Prorenin (2 nM) führen nach 5 Minuten zur ERK-Phosphorylierung. Diese ist bis zu 15 Minuten stark ausgeprägt. Nichtphosphoryliertes ERK dient als Ladungskontrolle b.) Für eine Quantifizierung dieser Ergebnisse wird die optische Dichte nach 5 minütiger Stimulation mit Prorenin auf 100 % gesetzt und dazu der prozentuale Anteil der optischen Dichte der anderen Zeitpunkte berechnet.

In Maus-VSMC, die keinen AT1a-Rezeptor exprimieren, kann nach Stimulation mit Renin oder Prorenin für 10 Minuten gezeigt werden, dass auch hier jeweils eine ERK-Phosphorylierung induziert wird. Das ist ein weiterer Hinweis für die AT1a-Rezeptor-Unabhängigkeit der Renin- und Prorenin-vermittelten ERK-Phosphorylierung (Abbildung 38).

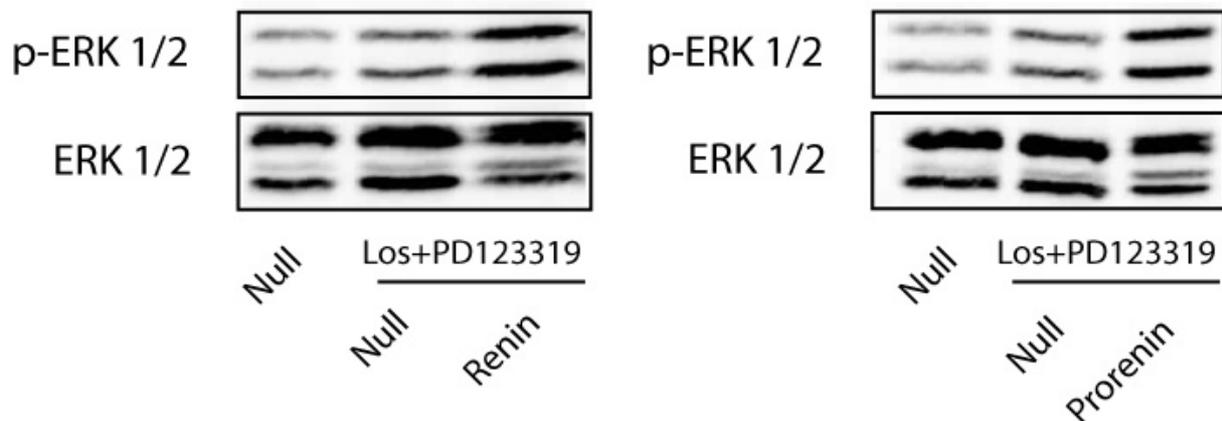


Abbildung 38: Western-blot-Experimente in AT1a-Rezeptor-knock-out-VSMC der Maus

Renin (links) und Prorenin (rechts) induzieren auch ERK-Phosphorylierungen in AT1a-Rezeptor-knock-out-VSMC der Maus. Die Zellen werden mit Losartan (10 μ M) und PD123319 (10 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Renin (10 nM) oder Prorenin (2 nM) für jeweils 10 Minuten stimuliert. ERK dient als Ladungskontrolle. Die Ergebnisse sind ein Beweis für die Angiotensin II-Unabhängigkeit der Renin- und Prorenin-vermittelten ERK-Phosphorylierung.

In weiteren Experimenten sollen die Einflüsse von Aliskiren, HRP und MEK-Inhibitor PD98059 auf die Renin- und Prorenin- induzierten ERK-Phosphorylierungen in humanen CASMC untersucht werden. Auch hier beeinflusst weder Aliskiren noch HRP die Renin- oder Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung. (Abbildung. 39-41). Im Gegensatz zu Aliskiren und HRP werden die Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen durch 30 Minuten Vorinkubation mit dem MEK-Inhibitor PD98059 (10 μ M) signifikant reduziert. (Abbildung 42 und 43).

7.1.13 Einfluß von Aliskiren auf (Pro)renin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in CASMC

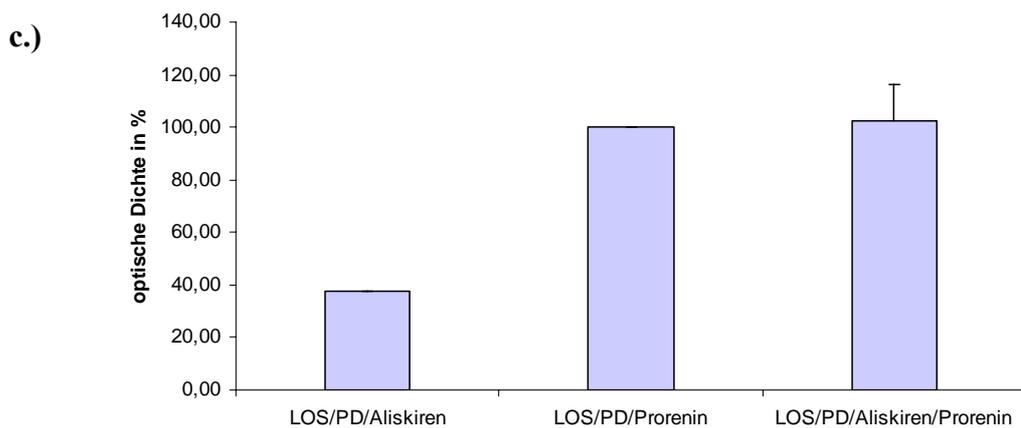
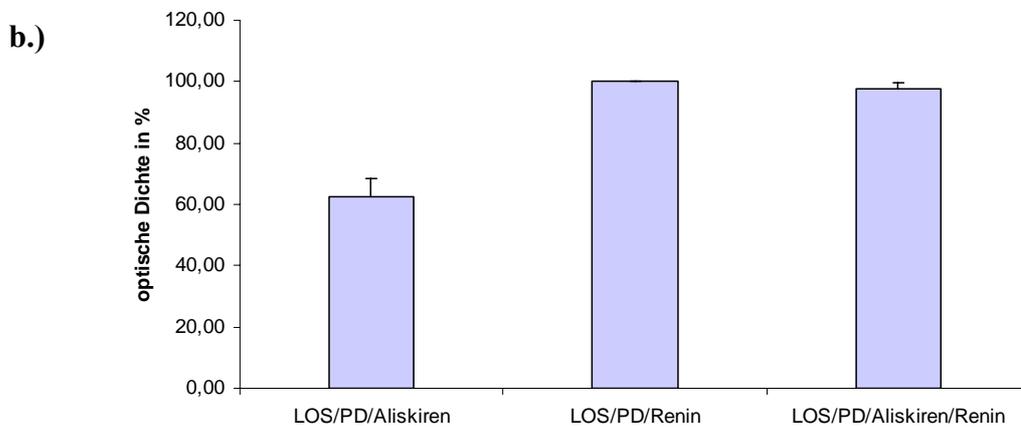
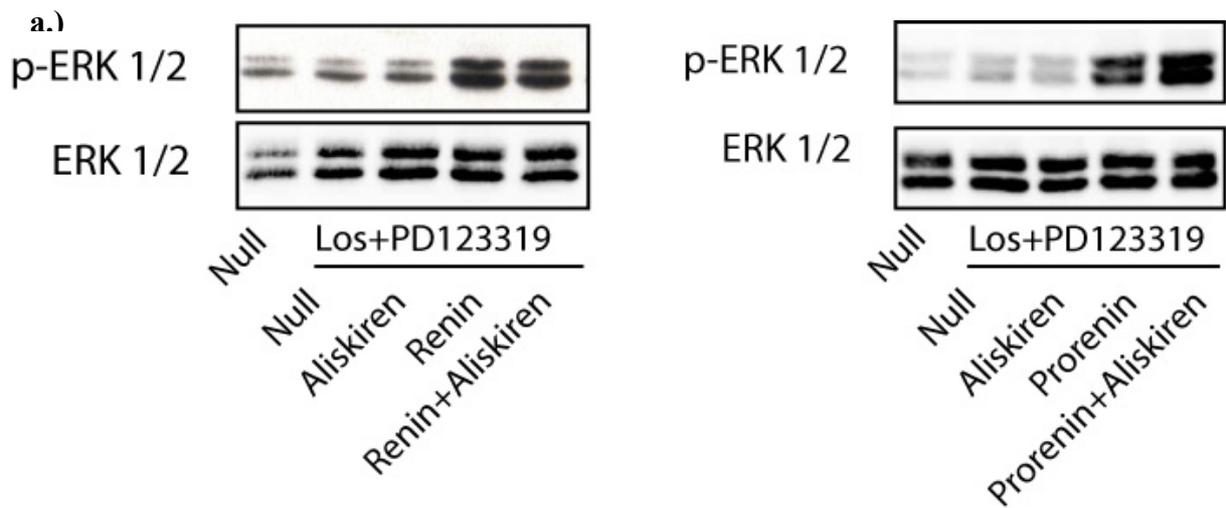


Abbildung 39: Experimente mit Aliskiren in CASMC

Die Abbildung a.) zeigt die Wirkung von Aliskiren (10 μ M) auf Renin (10 nM, links)- und Prorenin (2nM, rechts)-induzierte ERK-Phosphorylierungen (oben) mit ERK als Ladungskontrolle (unten). Weder Renin- noch Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung wird durch Vorinkubation der CASMC mit Aliskiren abgeschwächt. Eine Quantifizierung und statistische Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung a.) beweist, dass Vorinkubation der CASMC mit Aliskiren und anschließende Stimulation mit Renin (b.) oder Prorenin (c.) keine signifikante Abschwächung der Renin- oder Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung bewirkt ($p > 0,05$).

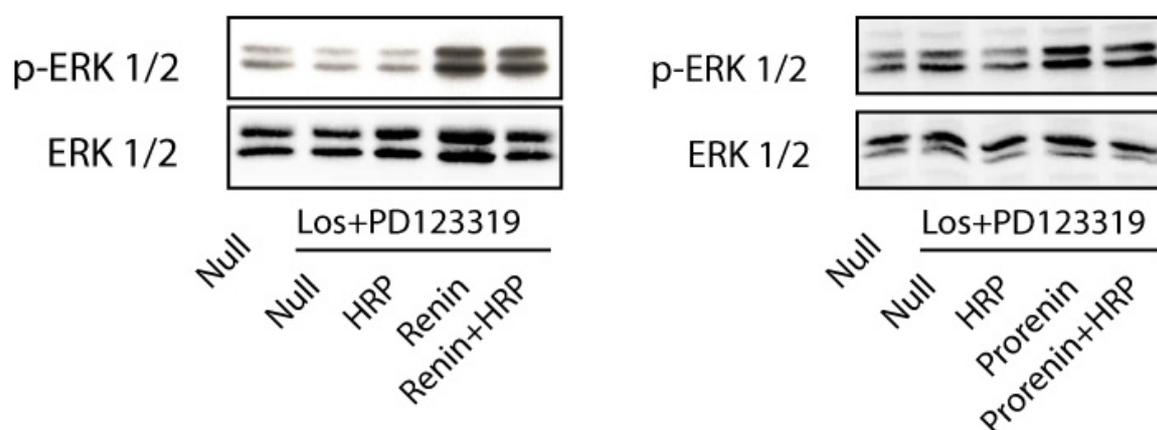
7.1.14 Einfluß von HRP auf (Pro)renin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in CASMC

Abbildung 40: Einfluß von HRP auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in CASMC
Vorinkubation der CASMC mit HRP (1 μ M) für 30 Minuten und anschließende Stimulation mit Renin (10 nM; links) oder Prorenin (2 nM; rechts) für 10 Minuten führt zu keiner Abschwächung der Renin- oder Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung. Nichtphosphoryliertes ERK dient als Ladungskontrolle.

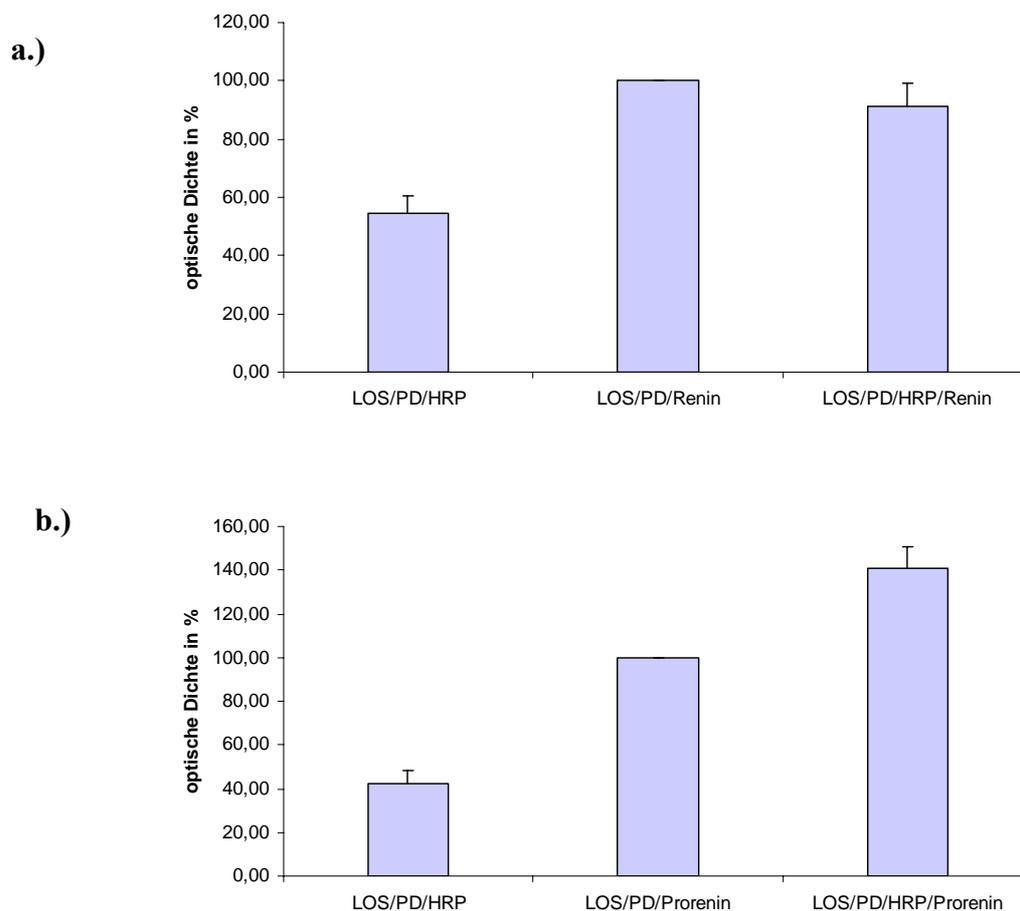


Abbildung 41: Quantifizierung der Experimente mit HRP in CASMC

Eine Quantifizierung und statistische Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 40 beweist, dass Vorinkubation der CASMC mit HRP (1 μ M) und anschließende Stimulation mit Renin (10 nM) (a.) oder Prorenin (2nM) (b.) keine signifikante Abschwächung der Renin oder Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung bewirkt ($p > 0,05$). Die optische Dichte der Renin-(a.) oder Prorenin-(b.)-induzierten ERK-Phosphorylierung wird auf 100 % gesetzt und der prozentuale Anteil der optischen Dichte nach jeweiliger Vorinkubation der Zellen mit HRP dazu berechnet.

7.1.15 Einfluß eines MEK-Blockers auf die (Pro)renin-inuzierte ERK1/2-Phosphorylierung in CASMC

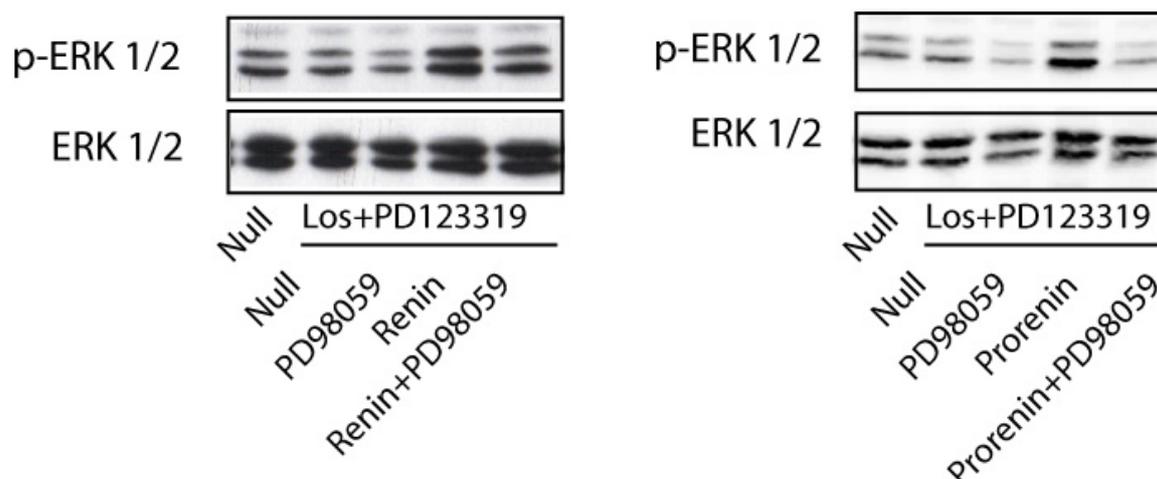


Abbildung 42: Einfluß des MEK-Inhibitors auf (Pro)renin-induzierte ERK-Phosphorylierung in CASMC
Vorinkubation der CASMC mit dem MEK-Inhibitor PD98059 (10 μ M) für 30 Minuten und anschließende Stimulation mit Renin (10 nM; links) oder Prorenin (2 nM; rechts) für 10 Minuten führt zu einer Abschwächung der Renin- oder Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung. Nichtphosphoryliertes ERK dient als Ladungskontrolle.

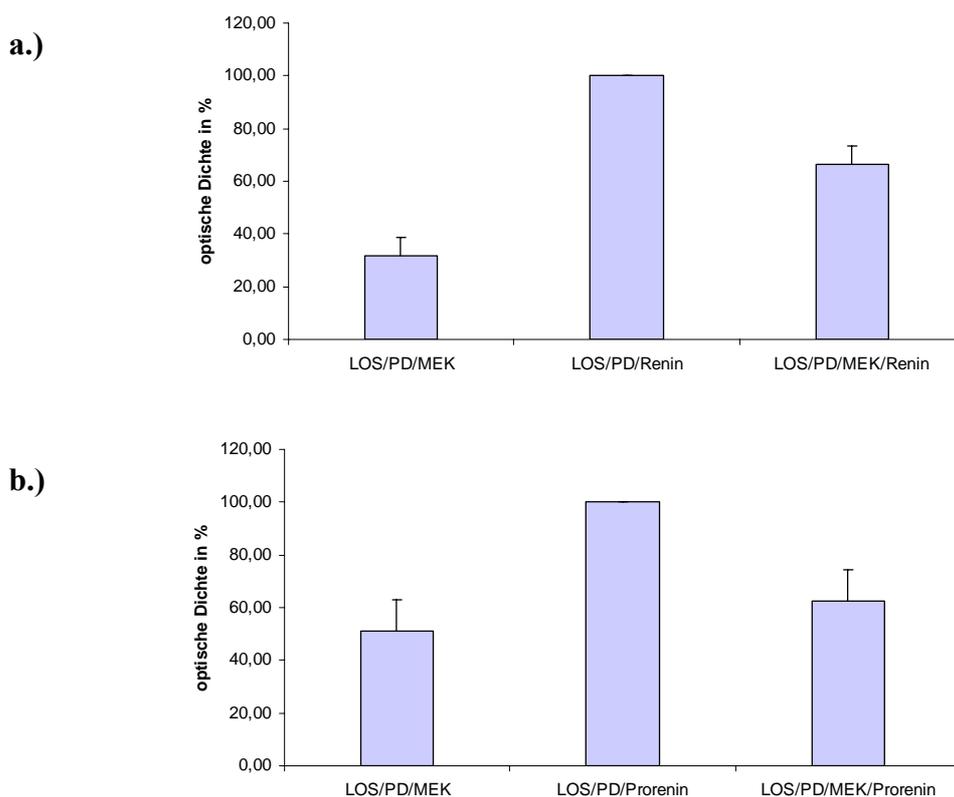


Abbildung 43: Quantifizierung der Experimente mit dem MEK-Inhibitor PD98059 in CASMC

Eine Quantifizierung und statistische Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 42 beweist, dass Vorinkubation der CASMC mit PD98059 (10 μ M) und anschließende Stimulation mit Renin (10 nM; a.) oder Prorenin (2nM; b.) eine signifikante Abschwächung der Renin oder Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung bewirkt ($p < 0,05$). Die optische Dichte der Renin-(a.) oder Prorenin-(b.)-induzierten ERK-Phosphorylierung wird auf 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der optischen Dichte nach jeweiliger Vorinkubation der Zellen mit PD98059 dazu berechnet.

7.2 Vergleich der Wirkungen von Aliskiren und HRP in dTGR

Zu Beginn der Studie werden die Tiere in 4 Gruppen eingeteilt. Es gibt Placebo-behandelte dTGR, Aliskiren-behandelte dTGR (3mg/kg KG/d in Minipumpen), HRP-behandelte dTGR (3,6 µg/kg KG/d von jeweils humanem und Ratten-HRP) und unbehandelte, nichttransgene, gesunde Sprague-Dawley (SD)-Ratten als Kontrollen.

7.2.1 Einfluß von Aliskiren und HRP auf Blutdruck und Sterblichkeit in dTGR

Zunächst werden Mortalität und Blutdruck der Tiere untersucht. Das Überleben der Tiere wird mit der Kaplan-Meier Methode berechnet. Die Sterblichkeit der Placebo-behandelten Tiere in der 7. Woche liegt bei 48 %. Zum gleichen Zeitpunkt ist keine Aliskiren behandelte dTGR gestorben. Die Sterblichkeit in HRP-behandelten Tieren beträgt demgegenüber sogar 58 %. Alle nichttransgenen SD-Ratten überleben bis zum Ende der Studie (Abbildung 44a).

Der Blutdruck wird mittels Manschetten-Methode wöchentlich gemessen. Aliskiren normalisiert den systolischen Blutdruck (106 ± 3 für Aliskiren und 111 ± 1 mm Hg für SD; (Abbildung 44b.). Im Gegensatz zu Aliskiren behandelten dTGR entwickelten HRP-behandelte dTGR ähnlich hohen Blutdruck wie Placebo-behandelte dTGR (196 ± 9 für HRP versus 210 ± 5 mm Hg für dTGR; Abbildung 44b.).

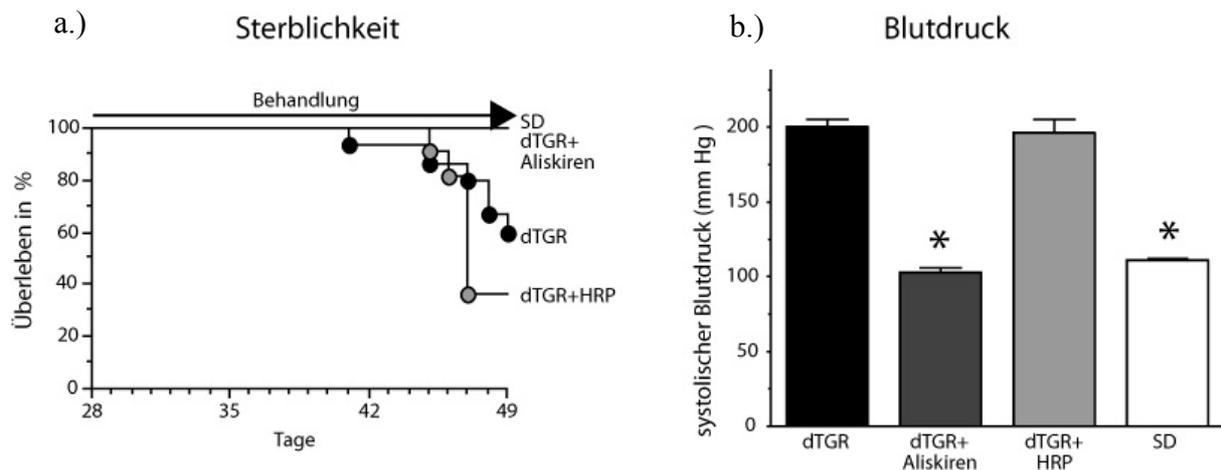


Abbildung 44: Wirkungen von Aliskiren und HRP auf die Sterblichkeit und den Blutdruck

a.) Die Abbildung zeigt das Überleben der dTGR nach 49 Tagen in Prozent nach Kaplan Meier Methode. Die Sterblichkeit wird durch HRP (3,6 µg/kg KG/d von jeweils humanem und Ratten-HRP) in der 7. Lebenswoche der dTGR im Vergleich zu Placebo-behandelten dTGR nicht verbessert. Dagegen überleben zu diesem Zeitpunkt alle Aliskiren (3mg/kg KG/d) in Minipumpen behandelten Tiere. b.) Der Blutdruck wird in HRP-behandelten dTGR im Vergleich zu Placebo-behandelten dTGR nicht gesenkt. Aliskirenbehandlung dagegen bewirkt eine Blutdrucksenkung auf Kontrollniveau. Diese Blutdrucksenkung ist gegenüber Placebo-behandelten dTGR und HRP-behandelten dTGR signifikant ($P < 0,05$). Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

7.2.2 Einfluß von Aliskiren und HRP auf den Nierenschaden in dTGR

Zur Beurteilung des Nierenschadens im Krankheitsverlauf wird als funktioneller Parameter die Albuminurie bestimmt. Während Aliskiren die Albuminurie normalisiert, kann in HRP-behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren keine Senkung der Albuminwerte im Urin nachgewiesen werden (Abbildung 45 a).

Cystatin C ist ein Cystein-Protease-Inhibitor, der sich durch eine konstante Bildungsrate auszeichnet. Es wird frei von der gesunden Niere filtriert, tubulär rückresorbiert und abgebaut. Die Serumkonzentration hängt ausschließlich von der glomerulären Filtrationsleistung der Niere ab. Cystatin C stellt also einen Marker für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) dar. Die Höhe der Werte ist umgekehrt korreliert zur GFR, demnach ist die GFR bei hohen Cystatin C-Werten eingeschränkt und umgekehrt. Eine Behandlung mit Aliskiren kann die Cystatin C-Werte auf Kontrollniveau senken und damit die GFR verbessern. In HRP-behandelten dTGR sind die Cystatin C-Werte ähnlich hoch wie in Placebo-behandelten dTGR. HRP-Behandlung führt also zu keiner Verbesserung der GFR im dTGR-Modell (Abbildung 45b).

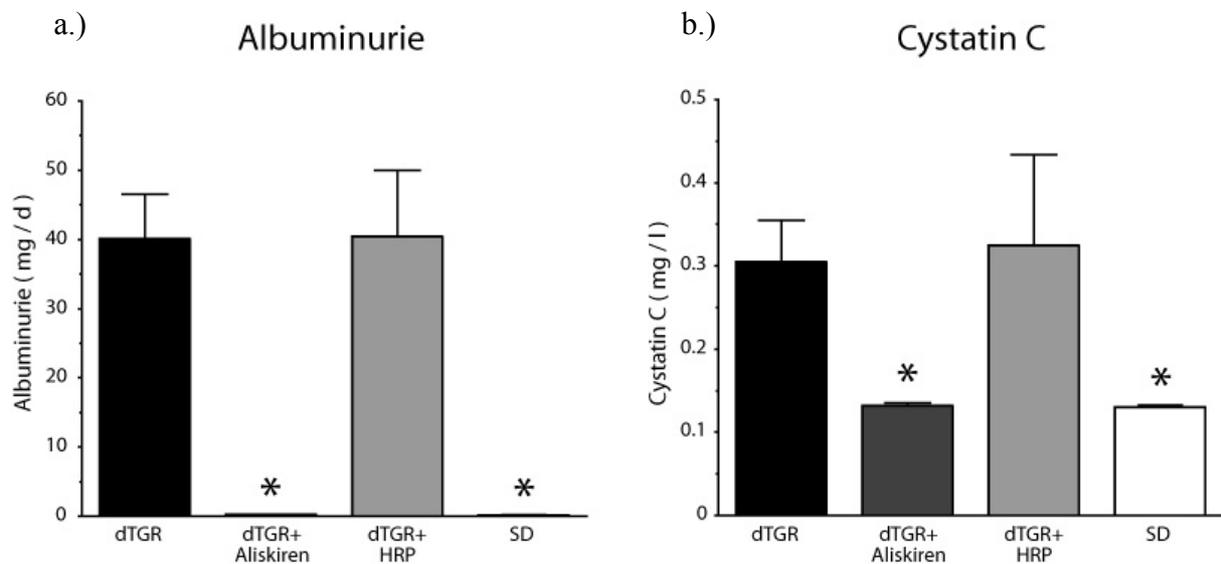


Abbildung 45: Einfluß von Aliskiren und HRP auf Albuminurie und GFR

a.) Aliskirenbehandlung (3mg/kg KG/d) bewirkt in dTGR eine Umkehrung der Albuminurie, während HRP (3,6 µg/kg KG/d von jeweils humanem und Ratten-HRP) die Albuminurie nicht verbessert. b.) Aliskiren-Behandlung senkt die Cystatin C-Werte im Serum der dTGR auf Kontrollniveau und führt damit zu einer starken Verbesserung der GFR. HRP hat wiederum keinen Einfluß auf den erhöhten Cystatin C-Wert und damit auf die schlechte GFR in dTGR. Die Senkung des Albuminwertes im Urin und die Senkung der Cystatin C-Werte im Serum der dTGR durch Aliskiren sind hoch signifikant ($P < 0,05$ versus Placebo-behandelte dTGR und HRP behandelte dTGR). Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Neutrophile Gelatinase associated Lipocalin (Ngal) ist ein Marker für Tubulusschaden. Entsprechend ist die m-RNA-Expression von Ngal bei Tubulusschaden sehr hoch. Dieser Anstieg von Ngal ist anhaltend und korreliert mit anderen Werten, die eine Verschlechterung des Nierenschadens erkennen lassen, wie z. B. erhöhte Proteinausscheidung im Urin und erniedrigte GFR. Zur Untersuchung der Ratten-Ngal-mRNA-Expression in dieser Studie werden ganze Nieren oder die tubulo-interstielle Fraktion und Gefäße isoliert.

Die Ratten-Ngal-mRNA-Expression in den Nieren der dTGR ist im Vergleich zu SD-Ratten stark erhöht (Faktor: 15). Aliskirenbehandlung bewirkt eine starke und signifikante ($p < 0,05$) Senkung der rNgal-mRNA-Expression und konform damit eine starke Verbesserung des Tubulusschadens. HRP-Behandlung senkt die Ratten-Ngal-mRNA-Expression leicht, aber nicht signifikant ($p > 0,05$) (Abbildung. 46).

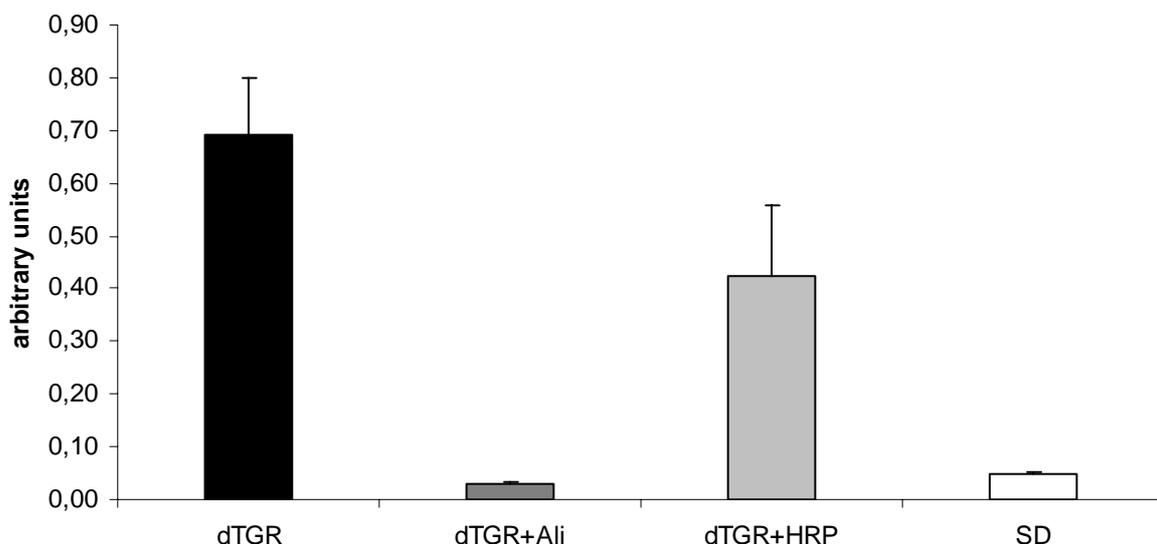


Abbildung 46: Ratten-Ngal-mRNA-Expression in der Rattenniere von 7 Wochen alten Ratten

Aliskirenbehandlung (3mg/kg KG/d) führt zu einer signifikanten Senkung der Ratten-Ngal-m-RNA-Expression auf Kontrollniveau ($p < 0,05$) und damit zu einer starken Verbesserung des Tubulusschadens. HRP (3,6 μ g/kg KG/d) senkt die Ratten-Ngal-mRNA-Expression leicht, aber nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Expressionswerte sind normalisiert auf 18S. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Bei der Untersuchung der tubulo-interstitiellen Fraktion und Gefäßen von dTGR, HRP-behandelten dTGR und SD kann nachgewiesen werden, dass HRP die Ratten-Ngal-mRNA-Expression nicht senkt und damit zu keiner Verbesserung des Tubulusschadens beiträgt (Abbildung 47).

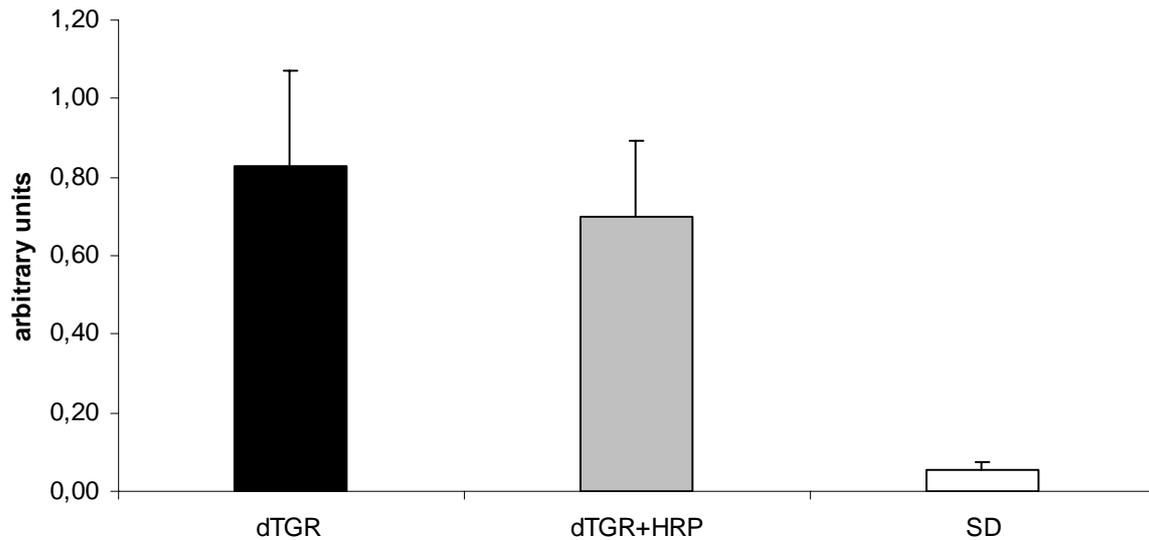


Abbildung 47: Ratten-Ngal-mRNA-Expression in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen

Die Ratten-Ngal-mRNA-Expression ist in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen von dTGR gegenüber SD-Ratten stark erhöht. HRP (3,6 µg/kg KG/d von jeweils humanem und Ratten-HRP) führt zu keiner signifikanten Senkung der mRNA-Expression in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen ($p > 0,05$). Die Expressionswerte sind normalisiert auf 18S.

7.3 Untersuchung verschiedener Tiermodelle mit unterschiedlich aktiviertem RAS

In einer weiteren Studie wollen wir den Einfluss von hohem Renin, hohen Renin- und Angiotensin II-Spiegeln mit Organschäden und die Normalsituation untersuchen. Dazu haben wir TGR(hRen), dTGR und SD-Ratten verwendet.

7.3.1 Untersuchungen in sieben Wochen alten Ratten

Zunächst werden die Ratten-(P)RR-mRNA-Expressionen in Niere, Leber und Herz in sieben Wochen alten Ratten untersucht. Dabei kann die höchste Expression in der Niere nachgewiesen werden. Verhältnismäßig wenig Ratten-(P)RR-mRNA wird in der Leber und im Herz exprimiert. In der Niere ist die Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in TGR(hRen) im Vergleich zu SD-Ratten signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Im Herzen dagegen sind die Ratten-(P)RR-Expressionen sowohl in TGR als auch in dTGR im Vergleich zu SD-Ratten signifikant erhöht ($p < 0,05$). In der Leber ist der Ratten-(P)RR in allen drei Tiergruppen gleich stark exprimiert (Abbildung 48).

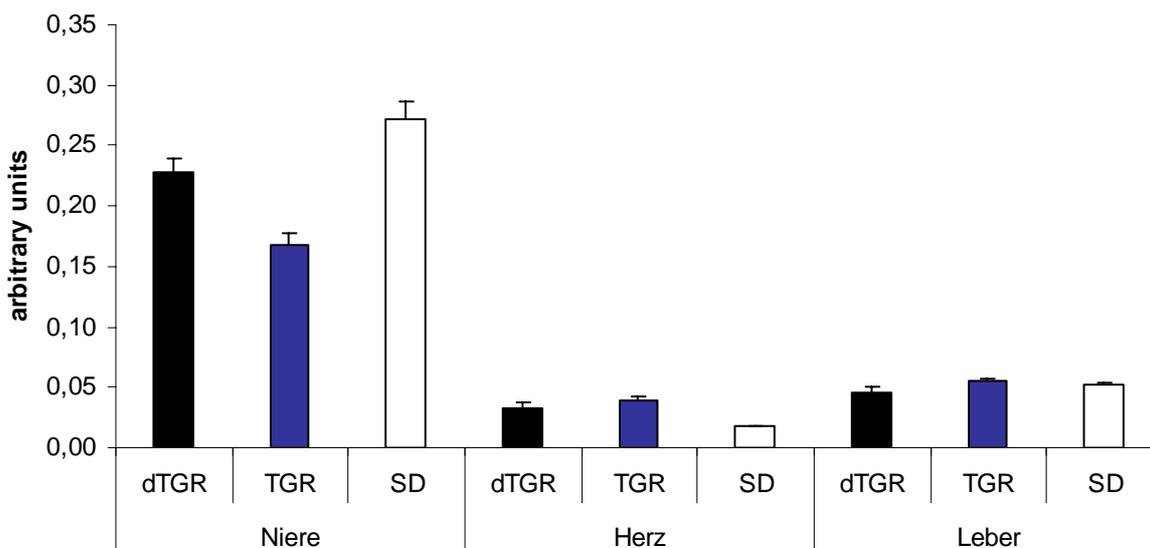


Abbildung 48: Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in der 7. Lebenswoche

Diese Abbildung zeigt die Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in Niere, Herz und Leber von jeweils 7 Wochen alten dTGR, TGR(hRen) und SD-Ratten. In den Nieren ist die Ratten-(P)RR-mRNA-Expression im Vergleich zu Herz und Leber in allen Tiermodellen deutlich erhöht. In den Nieren kommt es zur signifikanten Herunterregulation der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in den TGR(hRen) im Vergleich zu SD-Ratten ($p < 0,05$). Im Herz ist in TGR(hRen) und in dTGR eine signifikante Hochregulation der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression im Vergleich zu SD-Ratten nachweisbar ($p < 0,05$). Die Expressionswerte sind normalisiert auf 18S. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Die mRNA-Expressionen von Ratten-(P)RR, humanem Renin (hRenin), Ratten-Renin (rRenin) und Ratten-PI3K-p85alpha werden in den Rattennieren und teilweise auch in isolierten Glomeruli und in der tubulointestitiellen Fraktion und Gefäßen untersucht. Für Nieren stehen folgende Gruppen zur Verfügung: Placebo behandelte dTGR, Aliskiren behandelte dTGR (3mg/kg KG/d, per Minipumpe), SD-Ratten, TGR(hRen) und Aliskiren behandelte TGR(hRen) (3 mg/kg KG/d, per Minipumpe).

In Glomeruli und in der tubulointestitiellen Fraktion und Gefäßen werden folgende Versuchsgruppen untersucht: Placebo behandelte dTGR, HRP behandelte dTGR (3,6 μ g/kg KG/d von jeweils humanem und Ratten-HRP) und SD-Ratten.

In sieben Wochen alten Nieren ist die Genexpression für Ratten-(P)RR in TGR(hRen) im Vergleich zu SD-Ratten signifikant ($p < 0,05$) herunterreguliert. Eine Behandlung mit Aliskiren ändert dieses Expressionsverhalten nicht. dTGR und Aliskiren-behandelte dTGR zeigen keine Änderung der Ratten-(P)RR-Expression im Vergleich zu SD-Ratten (Abbildung 49).

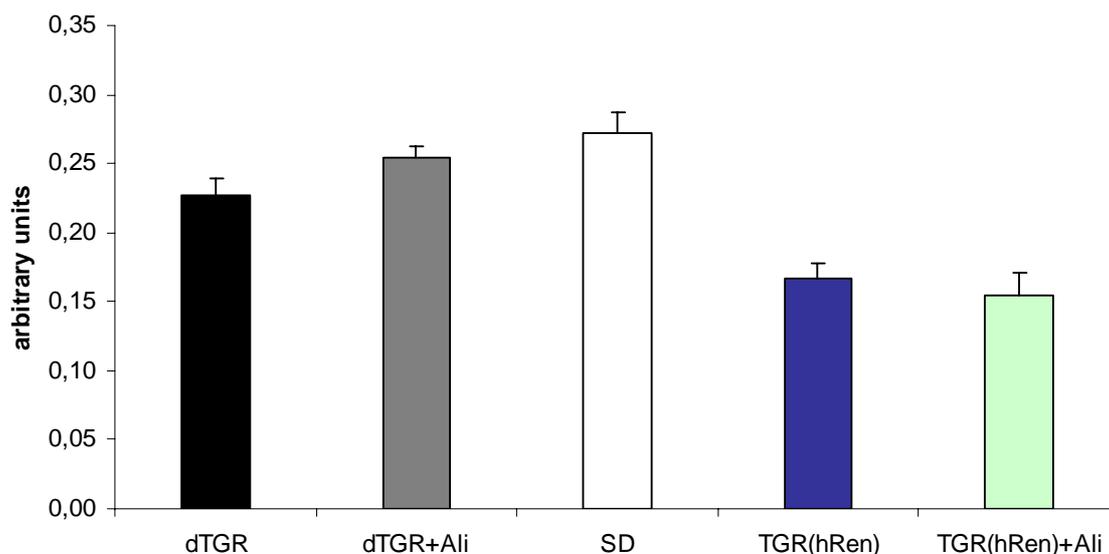


Abbildung 49: Rattens-(P)RR-mRNA-Expression in der Rattenniere

Diese Abbildung zeigt die Rattens-(P)RR-mRNA-Expression in den Nieren von dTGR, Aliskiren-behandelten dTGR, SD-Ratten, TGR(hRen) und Aliskiren-behandelten TGR(hRen). In TGR(hRen) kommt es zur signifikanten Herunterregulation der Rattens-(P)RR-mRNA-Expression im Vergleich zu SD-Ratten ($p < 0,05$). Aliskirenbehandlung hat keinen Einfluß auf dieses Expressionsverhalten in TGR(hRen). Die Expressionswerte sind normalisiert auf 18S.

Bei entsprechenden mRNA-Expressionsuntersuchungen zum Rattens-(P)RR in Glomeruli von sieben Wochen alten dTGR, HRP behandelten dTGR und SD-Ratten kann eine signifikante ($p < 0,05$) Herunterregulation der Rattens-(P)RR-mRNA-Expression im Vergleich zu SD-Ratten gezeigt werden (Abbildung 50).

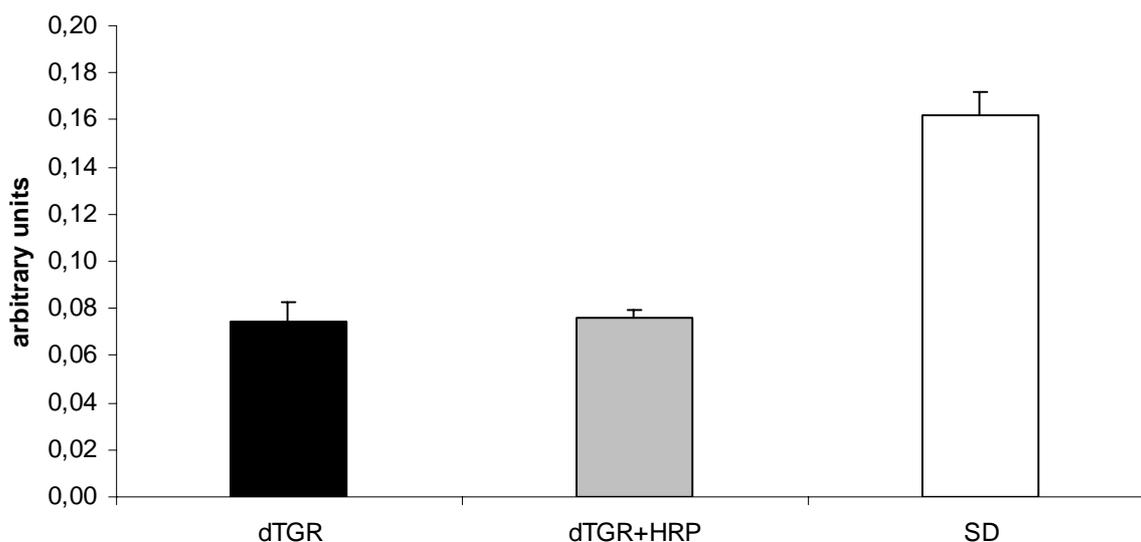


Abbildung 50: Rattens-(P)RR-mRNA-Expression in Glomeruli

Die Abbildung zeigt, dass Rattens-(P)RR-mRNA-Expressionen in Glomeruli von dTGR und HRP-behandelten dTGR im Vergleich zu SD-Ratten signifikant herunterreguliert sind ($p < 0,05$). Die Expressionswerte sind normalisiert auf 18S. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Die Ratten-(P)RR-mRNA-Expressionen in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen von 7 Wochen alten dTGR und HRP behandelten dTGR sind im Vergleich zu SD-Ratten nicht verändert (Abbildung 51).

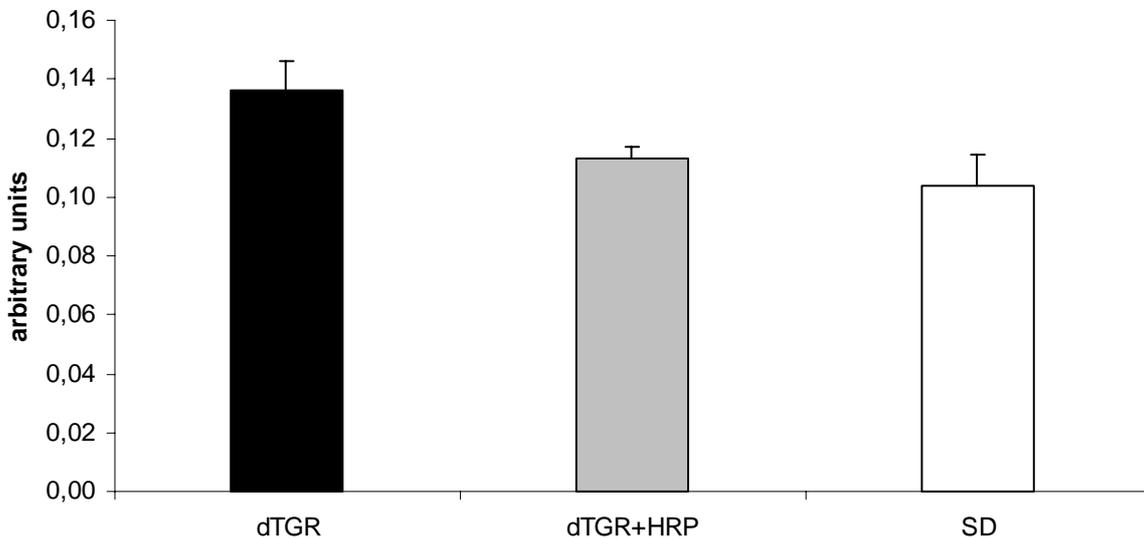


Abbildung 51: Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen

Die Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen ist in dTGR und HRP-behandelten dTGR gegenüber SD-Ratten nicht reguliert. Die Expressionswerte sind normalisiert auf 18S. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Als Nächstes wird die mRNA-Expression des humanen Renintransgens in der Niere untersucht (Abbildung 52). In nichttransgenen SD-Ratten kann humanes Renin-Gen nicht nachgewiesen werden und dient als Negativkontrolle. Die höchste Expression des Transgens wird aufgrund der homozygoten Vererbung in den TGR(hRen) gefunden. Eine Aliskirenbehandlung dieser Tiere hat keinen Einfluß auf das Expressionsniveau des Transgens in TGR(hRen). In dTGR kann eine um Faktor 4 erniedrigte Expression von humanem Renin im Vergleich zu TGR(hRen) gezeigt werden. Dieser Unterschied ist hoch-signifikant ($p < 0,05$). In dTGR bewirkt eine Aliskirenbehandlung eine signifikante Herunterregulierung der humanen Reninexpression im Vergleich zu Plazebo-behandelten dTGR ($p < 0,05$). Die deutlich niedrigere Expression von humanem Renin in dTGR im Vergleich zu TGR(hRen) kann auf eine heterozygote Vererbung des Transgens in dTGR zurückgeführt werden.

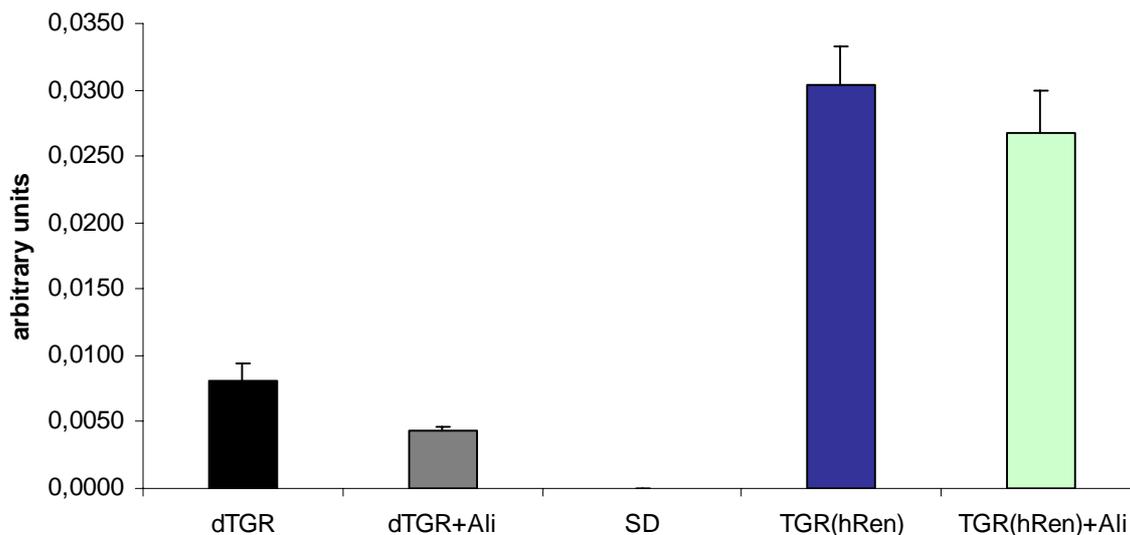


Abbildung 52: mRNA-Expression des humanen Renin-Transgens in der Rattenniere

Das humane Renin-Transgen ist auf mRNA-Ebene in TGR(hRen)-Nieren aufgrund der homozygoten Vererbung am höchsten exprimiert. Aliskirenbehandlung beeinflusst diese mRNA-Expression des Transgens in TGR(hRen) nicht. In dTGR ist die Expression des humanen Renintransgens durch die heterozygote Vererbung deutlich niedriger. Aliskirenbehandlung der dTGR bewirkt eine signifikante Herunterregulation der humanen Reningen-mRNA-Expression im Vergleich zu Plazebo-behandelten dTGR ($p < 0,05$). Die Expressionswerte sind normalisiert auf 18S. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Ratten-Reningen ist in SD-Ratten gut exprimiert. Im Vergleich zu SD-Ratten ist die Ratten-Renin-Genexpression in TGR(hRen) leicht erniedrigt und in dTGR um die Hälfte erniedrigt (Abbildung 53). Beide Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$). Die stärkere Herunterregulierung des Ratten-Reningens in dTGR deutet auf ein aktiviertes RAS in dTGR und der damit verbundenen negativen Feedbackschleife hin.

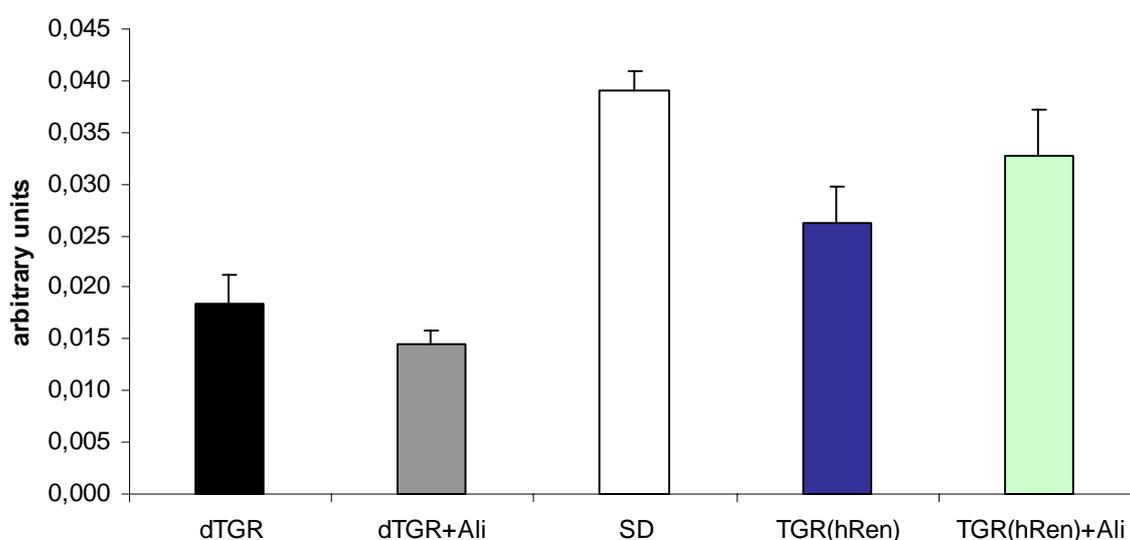


Abbildung 53: Ratten-Renin-mRNA-Expression in der Niere

Ratten-Renin-mRNA-Expression ist in dTGR und Aliskiren-behandelten dTGR gegenüber SD-Ratten um Faktor 2 erniedrigt. Dieses Expressionsverhalten ist bedingt durch ein aktiviertes RAS in dTGR. Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Bei Einwirkung hoher Renin- oder Proreninkonzentrationen auf HEK293-Zellen und Kardiomyoblasten kommt es zu einer Herunterregulation der (P)RR-mRNA-Expression im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen und zur gleichzeitigen Hochregulation der mRNA-Expression der p85alpha-Untereinheit von PI3Kinase. Das wiederum ist mit verstärkter Proliferation und verminderter Apoptose in Kardiomyoblasten verbunden [32].

Bei der Untersuchung der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in der Rattenniere kann eine erniedrigte Expression im TGR(hRen)-Modell im Vergleich zu SD-Ratten nachgewiesen werden (Abbildung 49). Falls der von Scheffe et al in HEK293-Zellen und Kardiomyoblasten beschriebene Mechanismus auch in Rattengeweben mit erniedrigter (P)RR-mRNA-Expression unter Hochreninbedingungen gültig ist, ist entsprechend eine Hochregulation der mRNA-Expression der Ratten-PI3Kp85alpha-Untereinheit zu erwarten. In dieser Arbeit wird allerdings kein Unterschied der Ratten-PI3Kp85alpha-mRNA-Expression zwischen TGR(hRen) und SD-Ratten in der Rattenniere gefunden (Abbildung 54). In Glomeruli von dTGR kann ebenfalls eine Herunterregulation der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression gezeigt werden (Abbildung. 50), die aber auch nicht mit einer entsprechenden Hochregulation der Ratten-PI3Kp85alpha-mRNA-Expression einhergeht (Abbildung 55). In der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen der dTGR kann kein Unterschied der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression zwischen dTGR und SD-Ratten gezeigt werden (Abbildung. 51). Allerdings kommt es hier zu einer Hochregulation der Ratten-PI3K-p85alpha-mRNA-Expression (Abbildung 56). Der Unterschied ist signifikant ($p < 0,05$). Für diese hier verwendeten Tiermodelle kann also die Hypothese der Herunterregulation der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression durch hohes Renin oder Prorenin mit gleichzeitiger Hochregulation der Ratten-PI3Kp85alpha-mRNA-Expression nicht bestätigt werden.

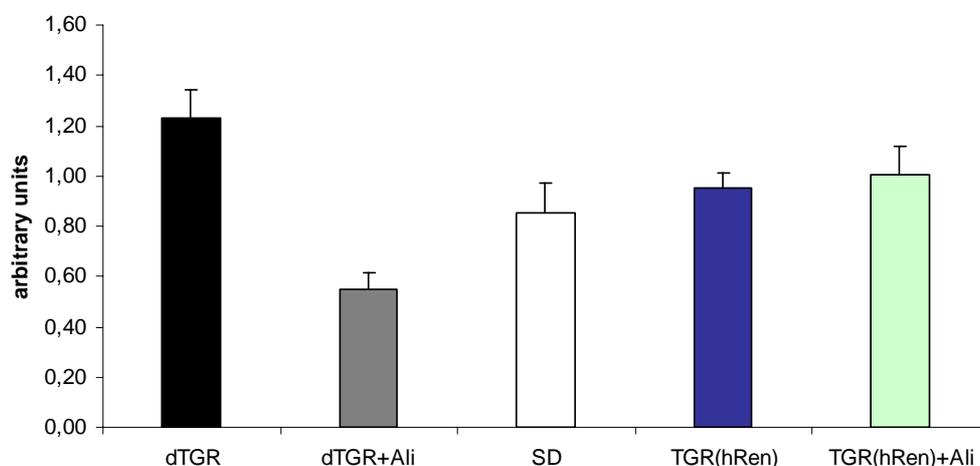


Abbildung 54: Ratten-PI3K-p85alpha mRNA-Expression in Rattennieren

In TGR(hRen) ist die mRNA-Expression von Ratten-PI3K-p85alpha-Gen im Vergleich zu SD-Ratten nicht erhöht. Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

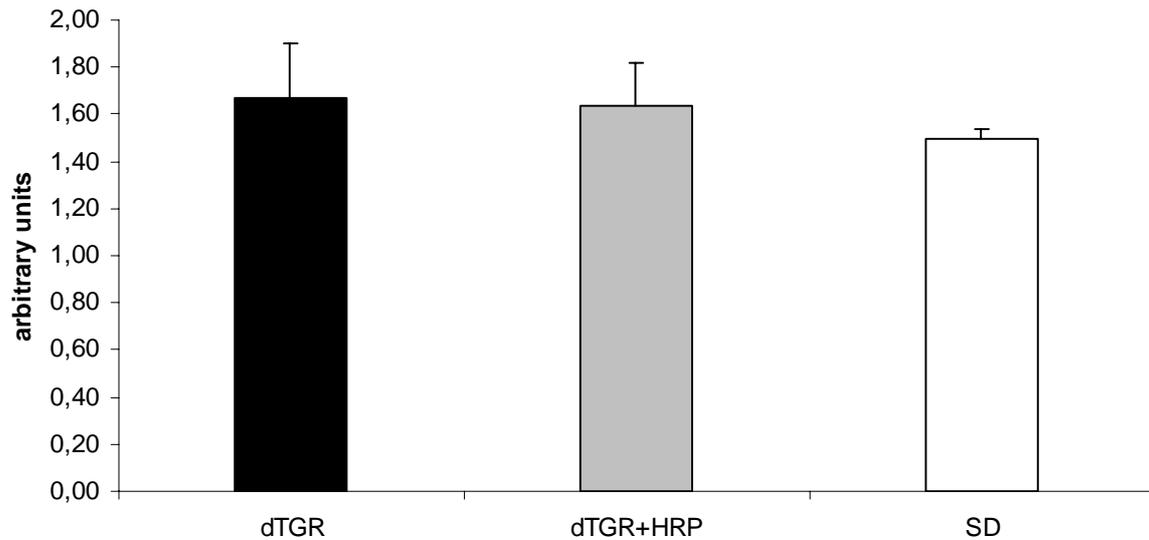


Abbildung 55: Rattens-PI3K-p85alpha mRNA-Expression in Ratten-Glomeruli

In dTGR und HRP behandelten dTGR ist die mRNA-Expression von Rattens-PI3K-p85alpha-Gen im Vergleich zu SD-Ratten nicht erhöht. Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

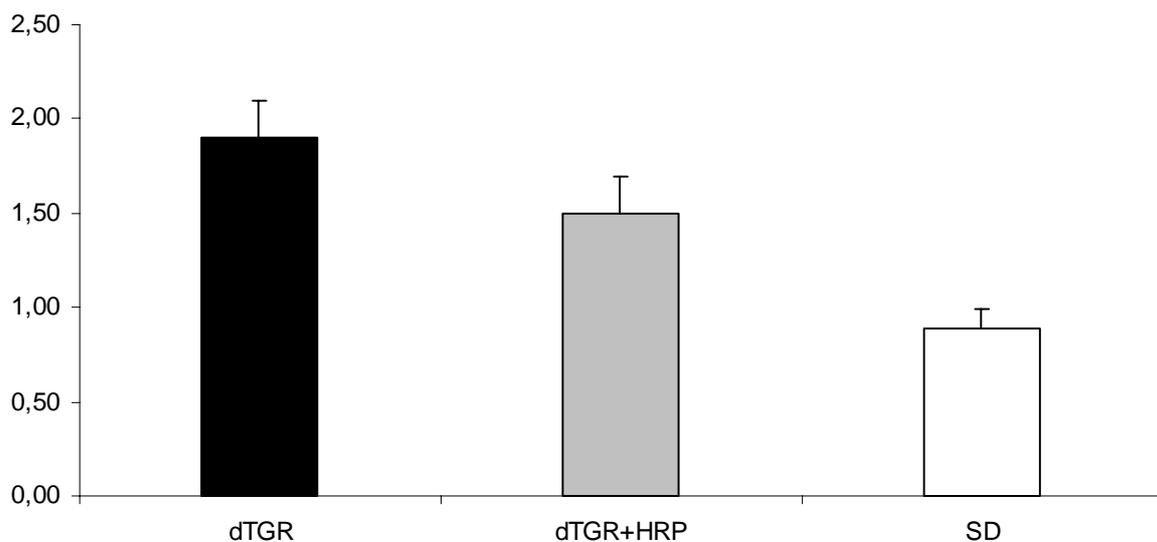


Abbildung 56: PI3K-p85alpha mRNA-Expression in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen

In dTGR und HRP behandelten dTGR ist die mRNA-Expression von Rattens-PI3K-p85alpha-Gen im Vergleich zu SD-Ratten signifikant erhöht ($p < 0,05$). Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

In sieben Wochen alten Rattenherzen werden zunächst die mRNA-Expressionen des Ratten-(P)RR in dTGR, in Aliskiren behandelten dTGR, in TGR(hRen) und in Aliskiren behandelten TGR(hRen) im Vergleich zu SD-Ratten untersucht (Abbildung 57). In TGR(hRen) kann eine deutlich gesteigerte Expression, in dTGR eine leicht gesteigerte Expression des Ratten-(P)RR im Vergleich zu SD-Ratten gemessen werden. Beide Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$). Die Behandlung mit Aliskiren senkt die erhöhte Expression in TGR(hRen) im Vergleich zu unbehandelten TGR(hRen) signifikant ($p < 0,05$).

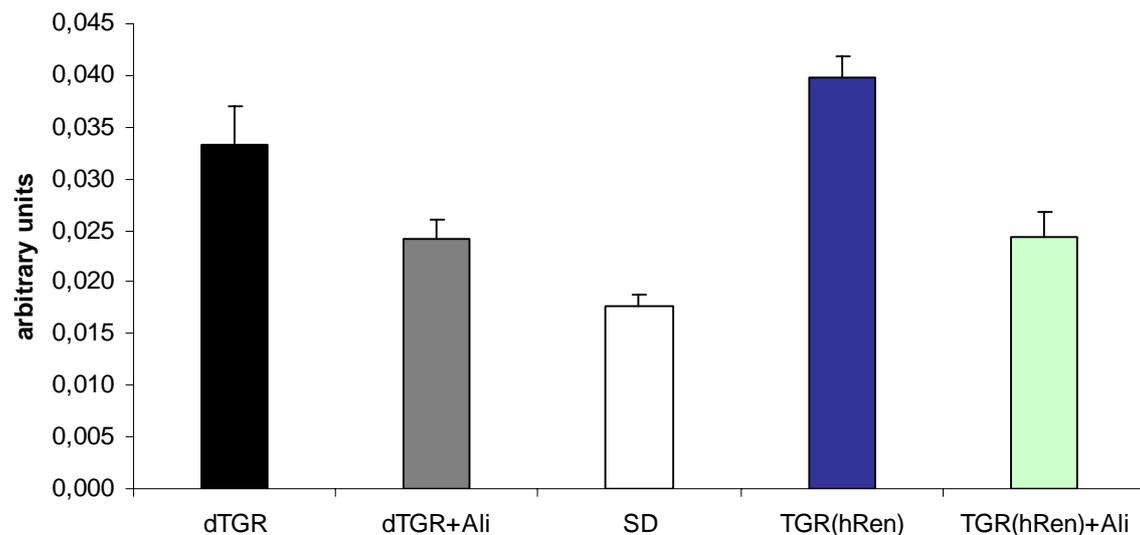


Abbildung 57: Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in Rattenherzen

In TGR(hRen) ist die (P)RR-mRNA-Expression deutlich, in dTGR leicht gesteigert gegenüber der (P)RR-mRNA-Expression in SD-Rattenherzen. Beide Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$). Eine Behandlung mit Aliskiren bewirkt in TGR(hRen) eine signifikante Herunterregulation im Vergleich zu unbehandelten TGR(hRen) ($p < 0,05$). Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Der Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) ist ein potenter Stimulator der Kollagenproduzierenden kardialen Fibroblasten. So führt die Überexpression von TGF β 1 zur gesteigerten Bildung von extrazellulären Matrixproteinen. Der Anstieg der extrazellulären Matrixproteine wiederum bedingt Fibrose. Für die in dieser Arbeit verwendeten Gruppen kann in 7 Wochen alten Rattenherzen gezeigt werden, dass TGF β 1-Genexpression in TGR(hRen) im Vergleich zu SD-Ratten um Faktor 2 erhöht ist (Abbildung 58). Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,05$). Für dTGR wird keine erhöhte TGF β 1-mRNA-Expression im Vergleich zu SD-Ratten gemessen. Aliskirenbehandlung führt in TGR(hRen) zu einer signifikanten Herunterregulation der Ratten-TGF β 1-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten TGR(hRen) ($p < 0,05$).

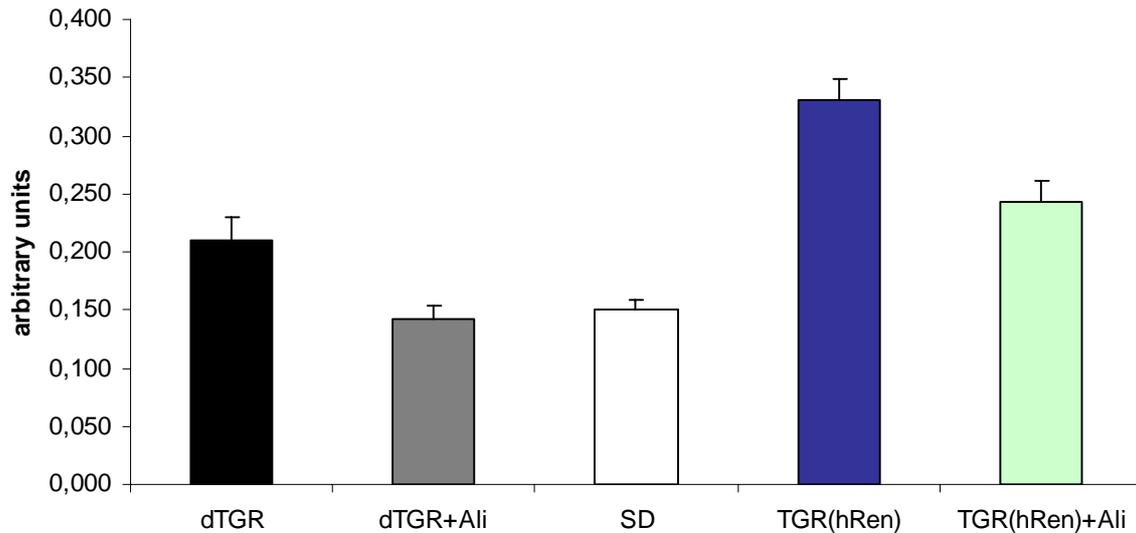


Abbildung 58: Rattent-GF β 1 mRNA-Expression in Rattenherzen

In TGR(hRen) ist die TGF β 1-mRNA-Expression im Vergleich zu SD-Ratten signifikant erhöht ($p < 0,05$). Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Als nächstes wird die Proteinexpression des Fibrosemarkers Kollagen I auf Rattenherzgewebeschnitten mit Immunocytochemie untersucht. Die Kollagen I-Ablagerung erfolgt perivaskulär. In SD-Ratten und Aliskiren-behandelten dTGR sind kaum entsprechende Kollagenablagerungen nachweisbar. In TGR(hRen) ist die Kollagenablagerung um das Gefäß im Vergleich zu SD-Ratten und Aliskiren-behandelten dTGR leicht erhöht. In Placebo-behandelten dTGR sind die stärksten perivaskulären Kollagen I-Ablagerungen nachweisbar (Abbildung 59).

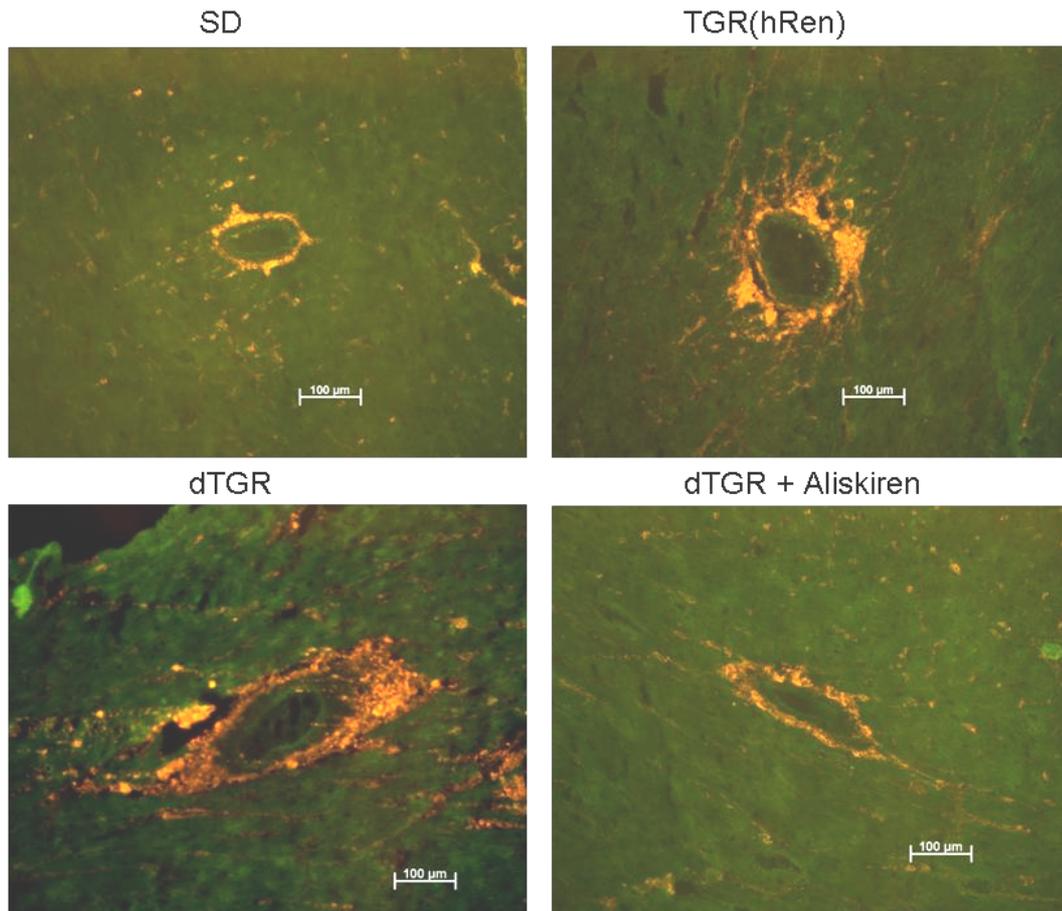


Abbildung 59: Kollagen I- Expression im Rattenherzgewebe

Die Abbildungen zeigen Rattenherzgewebe, die mit Cy3-markiertem Kollagen I -Antikörper angefärbt sind. Im Rattenherzgewebe der SD-Ratten und der mit Aliskiren behandelten dTGR sind kaum Kollagen I -Ablagerungen nachweisbar. Im Rattenherzgewebe der TGR(hRen) ist eine leicht erhöhte perivaskuläre Ablagerung von Kollagen I im Vergleich zu SD und Aliskiren-behandelten dTGR zu erkennen. In dTGR ist die perivaskuläre Kollagen I -Ablagerung am stärksten ausgeprägt.

In der Rattenleber ist der Ratten-(P)RR auf mRNA-Ebene in dTGR, TGR(hRen) und SD-Ratten gleich stark exprimiert (Abbildung 60).

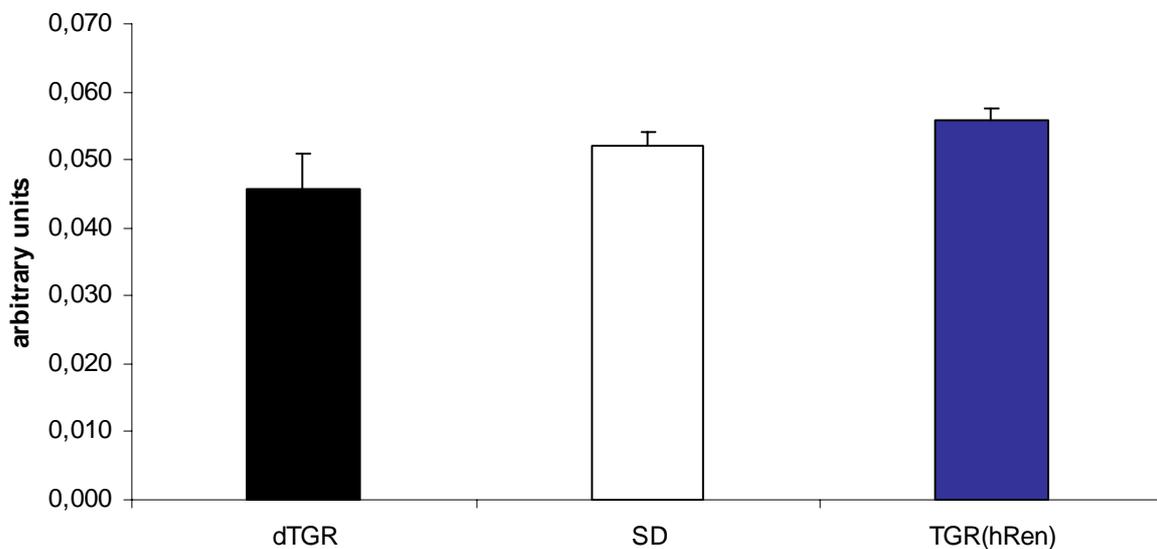


Abbildung 60: Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in der Rattenleber

In der Rattenleber ist der Ratten-(P)RR auf mRNA-Ebene in allen drei Tiergruppen gleich stark exprimiert. Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

7.3.2 Untersuchungen in 21 Wochen alten Ratten

Wegen der hohen Mortalität und den schweren Organschäden in der siebten Lebenswoche werden die dTGR zu diesem Zeitpunkt getötet.

Die TGR(hRen)-Tiere dagegen scheinen völlig gesund und leben weiter. Ab der 8. Lebenswoche kann man bei diesen Tieren allerdings eine starke Gewichtszunahme nachweisen. Diese Gewichtszunahme ist einerseits bedingt durch erhöhte Nahrungsaufnahme. Im Folgenden sind die Ergebnisse zur mRNA-Expression für verschiedene Gene beim Vergleich 21 Wochen alter TGR(hRen)-Tiere mit 21 Wochen alten normalgewichtigen SD-Ratten dargestellt.

Im Fettgewebe kann zunächst gezeigt werden, dass der Ratten-(P)RR in beiden Tiergruppen gut exprimiert wird und dass es keinen Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen gibt (Abbildung 61).

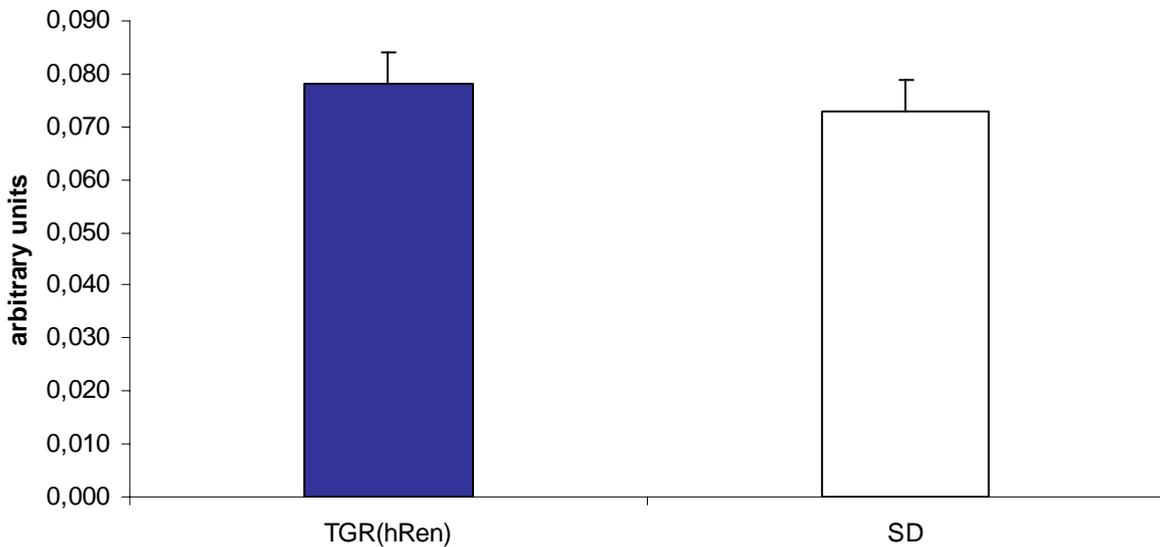


Abbildung 61: Ratten-(P)RR-mRNA-Expression im Fettgewebe

Im Fettgewebe von TGR(hRen) gibt es im Vergleich zu SD-Ratten keinen Unterschied in der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression. Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Die Expression des humanen Renin-Transgens verdoppelt sich von der 7. zur 21. Lebenswoche im Fettgewebe (Abbildung 62).

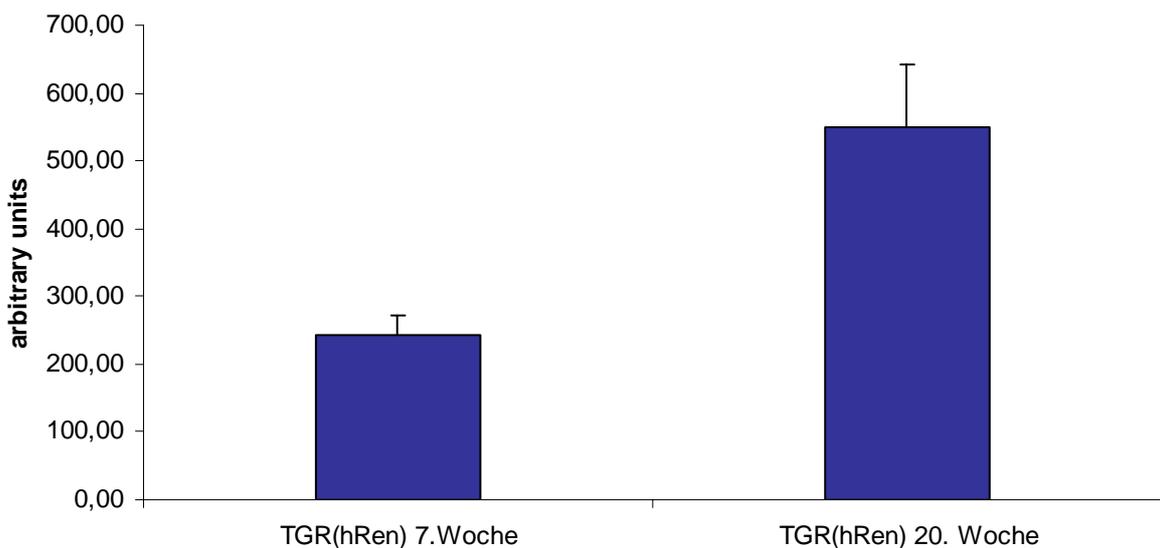


Abbildung 62: hRenin-mRNA-Expression im Fettgewebe

In TGR(hRen) verdoppelt sich die mRNA-Expression des humanen Renin-Transgens von der 7. zur 21. Lebenswoche. Die Werte sind normalisiert auf Ratten-GAPDH. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

In TGR(hRen) sind Ratten-Leptin-mRNA-Expressionswerte im Vergleich zu normalgewichtigen SD-Ratten erhöht (Abbildung 63). Der Unterschied ist signifikant ($p < 0,05$). In unserer Arbeitsgruppe sind gleichzeitig erhöhte Leptin-Plasmaspiegelwerte in einer entsprechenden Elisa-Messung in TGR(hRen) gegenüber altersgleichen SD-Ratten nachgewiesen worden. Die Fettleibigkeit der transgenen Tiere scheint zumindest teilweise durch eine Unempfindlichkeit gegenüber Leptin an seinem Wirkort, also hauptsächlich am Gehirn, bedingt zu sein. Eine solche Resistenz ist dann mit gesteigerten Leptinleveln assoziiert. Dafür spricht auch die gesteigerte Nahrungsaufnahme der TGR(hRen) im Vergleich zu SD-Ratten.

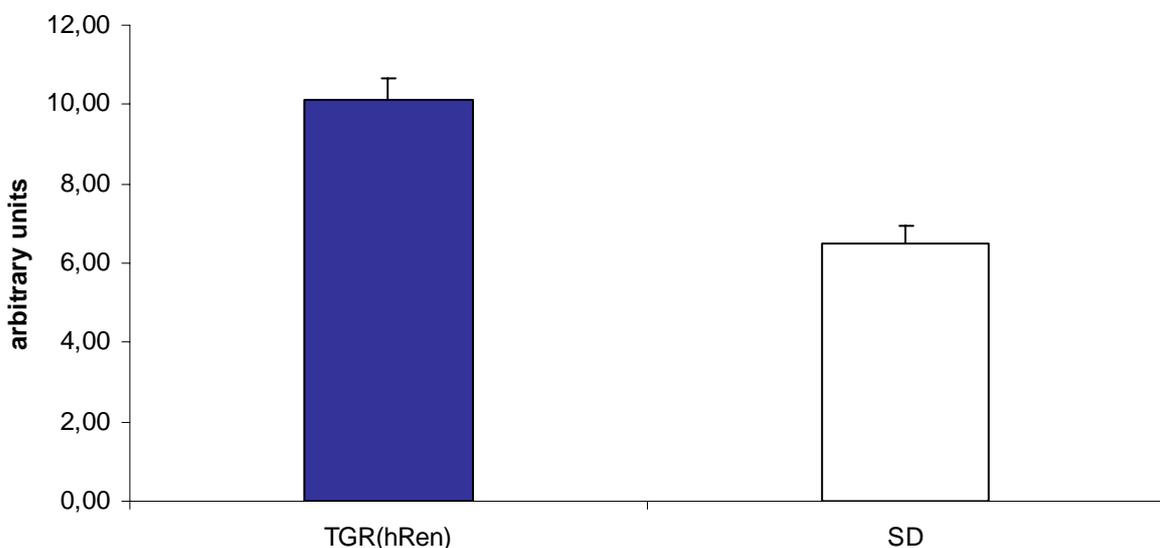


Abbildung 63: Ratten-Leptin-mRNA-Expression im Fettgewebe

In TGR(hRen) ist die Ratten-Leptin-mRNA-Expression im Vergleich zu SD-Ratten signifikant erhöht ($p < 0,05$). Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

In 21 Wochen alten Rattenherzen kann kein Unterschied der Ratten-(P)RR-mRNA-Expression zwischen TGR(hRen) und SD-Ratten nachgewiesen werden (Abbildung 64). Die in der 7. Woche in TGR(hRen) im Vergleich zu SD-Ratten signifikant erhöhte Ratten-(P)RR-mRNA-Expression sinkt bis zur 21. Woche wieder auf SD-Niveau. Die Expressionen für SD-Ratten und Aliskiren-behandelte TGR(hRen) bleiben über diesen Zeitraum unverändert.

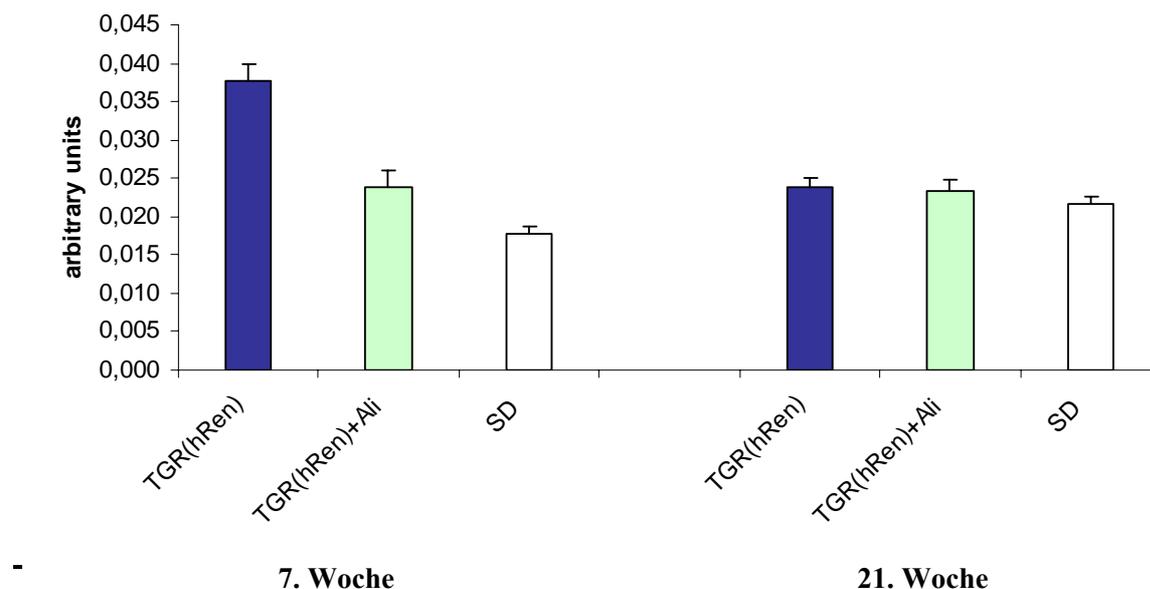


Abbildung 64: Vergleich der Ratten-(P)RR-mRNA-Expressionen im Rattenherz
 In TGR(hRen) sinkt die in der 7. Lebenswoche im Vergleich zu SD-Ratten erhöhte Ratten-(P)RR-mRNA-Expression bis zur 21. Lebenswoche auf SD-Niveau ab. Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

Die Expression von Ratten-TGFbeta1 ist in der 21. Lebenswoche zwischen den untersuchten Gruppen nicht reguliert (Abbildung 65). Die mRNA-Expression für Ratten-TGFbeta1 für TGR(hRen) und Aliskiren behandelte TGR(hRen) sinkt von der 7. zur 21. Lebenswoche auf SD-Niveau.

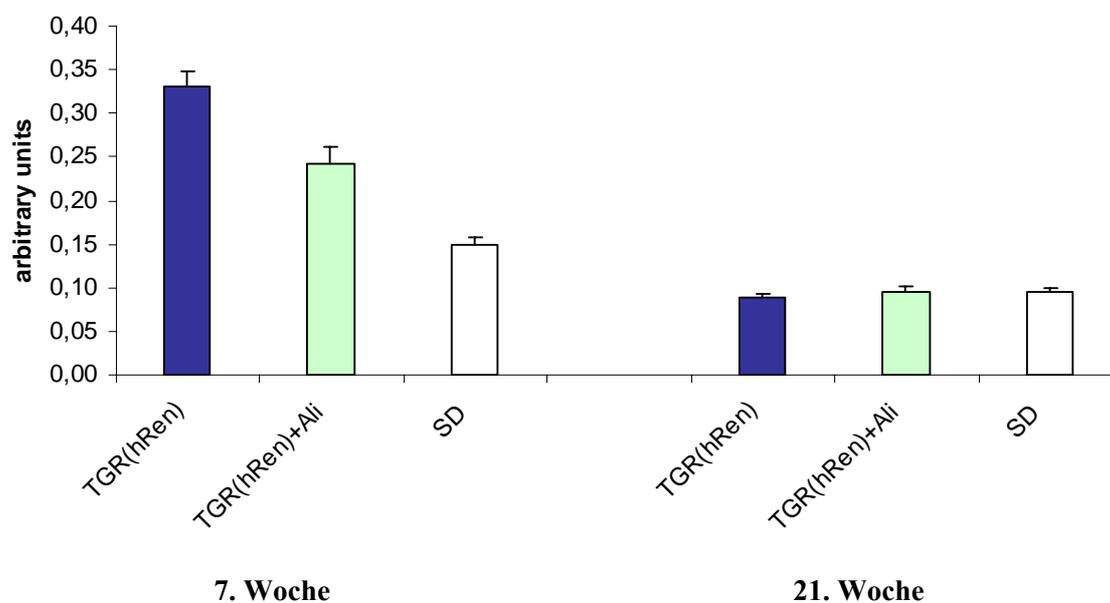


Abbildung 65: Vergleich der mRNA-Expressionen von Ratten-TGFbeta1
 Das mRNA-Expressionsniveau für Ratten-TGFbeta1 in SD-Ratten bleibt von der 7. zur 21. Lebenswoche unverändert. Die in der 7. Lebenswoche in TGR(hRen) und Aliskiren behandelten TGR(hRen) erhöhten Expressionswerte sinken bis zur 21. Lebenswoche auf SD-Niveau ab. Die Werte sind normalisiert auf 18S. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM.

8 Diskussion

Im Jahre 1998 feierte das RAS seinen 100. Geburtstag. Es spielt eine Schlüsselrolle in der Blutdruckkontrolle und im Salzhaushalt. Bis vor kurzem glaubte man, dass die Effektoren des RAS Angiotensin II und seine Rezeptoren sind. Diese Annahme basiert auf dem Glauben, dass die RAS-Komponenten Renin, AOPEN und ACE, keine Rezeptoren haben und dass ihre Bildung und Aktivierung nur zur Bildung von Angiotensin II dient. Mit dem Nachweis der Existenz von einem lokalen RAS unabhängig vom zirkulierenden RAS ist die Suche von zellulären Bindungsstellen für AOPEN und Renin veranlasst worden.

Kürzlich ist der (P)RR, eine neue Komponente des RAS, kloniert worden. Dieser (P)RR könnte die Aufnahme von (Pro)renin ins Gewebe bewirken. Unerwarteterweise induziert der (P)RR auch Angiotensin II-unabhängige Wirkungen. Bisher weiß man, dass der (P)RR wichtig ist für die Bildung von Angiotensin II an der Zelloberfläche und eine funktionelle Rolle für Prorenin zur Verfügung stellt. Wenig ist bekannt über den Kontrollmechanismus der (P)RR-Expression, über die (Pro)renin-(P)RR-vermittelte Signaltransduktion und über die genaue Lokalisation des (P)RR. Weiter bleibt zu fragen, ob ein (P)RR-Blocker anderen RAS-Blockern überlegen ist. Die bisherigen Ergebnisse dazu sind teilweise diskrepant.

Einiges konnte mit dieser Arbeit beantwortet werden. Die dargestellten Ergebnisse werfen aber auch neue Fragen auf.

8.1 Lokalisation des (P)RR

Ursprünglich wurde der (P)RR als Rezeptor-assoziiertes Protein (M8-9) einer vakuolären ATPase identifiziert [24]. Nach neueren Untersuchungen liegt ein Großteil des (P)RR als intrazellulärer Transmembranrezeptor besonders im Zellkern und im endoplasmatischen Retikulum vor [32, 51]. Auf der Oberfläche von U937-Zellen kann mittels Durchflußzytometrie eine geringe Protein-Expression des (P)RR nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit anderen Ergebnissen kann auch in dieser Arbeit eine höhere (P)RR-Proteinexpression nach Permeabilisation der U937-Zellen und damit intrazellulär im Durchflußzytometer gezeigt werden. Möglicherweise wird Renin oder Prorenin von den Zellen aufgenommen und erst auf intrazellulären Membranen kommt es zur Bindung von Renin oder Prorenin an den (P)RR. Für diese Aufnahme von Renin und Prorenin in die Zellen kommt der M6PR nicht in Frage, da dieser nach der Aufnahme nur zur Degradation von Renin und Prorenin und nicht zu zellulären Effekten führt [20, 52]. Zwei

Rezeptoren, die an der Aufnahme von vielen Liganden in die Zelle verantwortlich sind, sind Megalin und Cubulin. Diese könnten vielleicht auch Renin und / oder Prorenin über Coated Pits in die Zellen aufnehmen. Andererseits könnte es sein, dass der (P)RR nicht permanent, sondern nur temporär auf der Zelloberfläche erscheint und daß dieses Erscheinen auf der Zelloberfläche durch bestimmte Reize getriggert wird, wie beispielsweise durch Stimulationen mit Renin oder Prorenin. Viele Reaktions- und Transporträume in der Zelle sind von spezifischen Elementarmembranen umschlossen. Zu diesen Zytomembranen zählt auch das ER, in dem der (P)RR schon nachgewiesen werden konnte [32]. Viele der Zytomembranen hängen untereinander zusammen und beliefern sich mit Membranmaterial über Vesikelströme (Membranfluß). Über einen solchen Fluß könnte der (P)RR temporär auf die Zelloberfläche gelangen. Die genaue Lokalisation des (P)RR muß noch besser untersucht werden. Da der (P)RR, wenn auch in geringen Mengen, auf der Oberfläche von U937-Zellen exprimiert wird, geht man angesichts der mangelnden Kenntnisse der (P)RR-Lokalisation in dieser Arbeit davon aus, dass die Renin- und Prorenin-vermittelte Signaltransduktion über den (P)RR auf der Zelloberfläche vermittelt wird.

8.2 ERK-Aktivierung in U937-Zellen und CASMC

Beim Vergleich der Zeitverläufe der Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen in U937-Zellen und CASMC ist auffällig, dass in CASMC die ERK-Phosphorylierung schon nach 5 Minuten beginnt und kurz andauernd ist, während sie in U937-Zellen deutlich später nach 15 bis 30 Minuten einsetzt und langanhaltend ist. Das deutet auf verschiedene Wege der Signaltransduktion durch Renin und Prorenin in verschiedenen Zelltypen hin.

Es ist bereits beschrieben worden, dass verschiedene Stimuli im gleichen Zelltyp [53] oder der gleiche Stimulus in verschiedenen Zelltypen [54] ERK-Phosphorylierungen von unterschiedlicher Dauer und unterschiedlich schnell induzieren. Die unterschiedlichen Aktivierungsdynamiken von ERK werden mit einer positiven oder negativen Feedbackschleife zwischen Raf-1 und ERK begründet. Kommt es nach Einwirkung des Stimulus zur kurzandauernden ERK-Phosphorylierung ist dafür eine negative Feedbackschleife zwischen ERK und Raf-1 verantwortlich, die das aktivierte ERK schnell wieder herunterreguliert. Kurzandauernde ERK-Phosphorylierung führt zur Proliferation.

Kommt es nach Einwirkung des Stimulus zur langanhaltenden ERK-Phosphorylierung ist dafür eine positive Feedbackschleife zwischen ERK und Raf-1 verantwortlich. Diese bewirkt, dass auch nach Entfernen des Stimulus die ERK-Phosphorylierung noch erhalten bleibt. Eine

langanhaltende ERK-Phosphorylierung führt zur Differenzierung von Zellen. Die Dauer der ERK-Phosphorylierung entscheidet also mit über das Schicksal der Zellen (Proliferation oder Differenzierung) [55, 56].

Die Mechanismen, die die Renin- und Prorenin-vermittelte ERK-Phosphorylierung bedingen, müssen weiter untersucht werden. Aus früherer Forschung ist bereits bekannt, dass die langanhaltende ERK-Phosphorylierung über die positive Feedbackschleife die Mitwirkung von PKC δ benötigt [54]. Daher wird in dieser Arbeit untersucht, ob ein PKC-Inhibitor die in U937-Zellen induzierte ERK-Phosphorylierung abschwächt. Es kann keine Abschwächung der Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung nachgewiesen werden. Eine Beteiligung der PKC an der Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen in U937-Zellen sollte trotzdem noch nicht ausgeschlossen werden. Bei dem hier verwendeten PKC-Inhibitor handelt es sich um einen PKC α/β -Blocker. Es sollten also auch andere Isoformen, insbesondere PKC δ -Blocker getestet werden.

8.3 Angiotensin II-unabhängige (Pro)renin-induzierte ERK-Aktivierung

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, Renin- und Prorenin-vermittelte ERK-Phosphorylierungen unabhängig von Angiotensin II zu untersuchen.

Angiotensin II vermittelt ERK-Phosphorylierung über den AT1-Rezeptor und nachfolgende Transaktivierung von EGF-Rezeptor [57, 58]. Um eine über Angiotensin II vermittelte ERK-Phosphorylierung auszuschließen, wird in den hier durchgeführten Signaltransduktionsuntersuchungen der AT1R-Blocker Losartan vor allen Stimulationsexperimenten 30 Minuten vorinkubiert. In AT1a-Rezeptor-knock-out-VSMC konnte nach Stimulation mit Renin und Prorenin die ERK-Phosphorylierung immer noch nachgewiesen werden. Somit kann eine durch Angiotensin II/AT1a-Rezeptor-Wechselwirkung bedingte ERK-Phosphorylierung in den hier präsentierten Ergebnissen ausgeschlossen werden. Diese Daten zeigen auch, dass keine Spezifität für die (Pro)renin/(P)RR-Signaltransduktion notwendig ist. In U937-Zellen kann gezeigt werden, dass bei Stimulation mit Renin oder Prorenin eine ERK-Phosphorylierung auftritt, die nicht der gleichzeitigen Phosphorylierung von EGF-Rezeptor bedarf. Auch dieses Ergebnis schließt eine über Angiotensin II/AT1R-Wechselwirkung vermittelte ERK-Phosphorylierung aus, da für eine Angiotensin II-vermittelte ERK-Phosphorylierung eine gleichzeitige Phosphorylierung des EGF-Rezeptors notwendig ist. Auch die über AT2R vermittelten Angiotensin II-Wirkungen werden durch 30 minütige Vorinkubation mit einem AT2R-Blocker PD123319 ausgeschlossen.

Der AT2R wird hauptsächlich im fetalen Gewebe exprimiert. Kurz nach der Geburt nimmt die Expression rapide ab. In der Niere, im Herzen und in den Blutgefäßen ist der Rezeptor aber noch vorhanden, wobei die mRNA-Expression aber kaum noch nachgewiesen werden kann [59]. Es ist bereits bekannt, dass eine Stimulation des AT2-Rezeptors mit Angiotensin II die AT1-Rezeptor-vermittelte MAPK-Aktivierung abschwächt. Der AT2-Rezeptor kann diese Abschwächung durch die Aktivierung verschiedener Phosphatasen auslösen [60]. Interessanterweise ist der AT2-Rezeptor auch mit PLZF gekoppelt. Ob es sich um die gleiche Signaltransduktionskaskade wie bei (P)RR-PLZF handelt, ist derzeit unklar. In den hier gezeigten Ergebnissen werden AT1- und AT2-Blocker vorinkubiert, um jegliche über Angiotensin II vermittelte Wirkungen auszuschließen.

Auch in anderen Arbeiten ist gezeigt worden, dass die durch Renin bedingte ERK-Phosphorylierung unabhängig von Angiotensin II ist. Huang et al haben den Einfluß von Ratten-Renin auf Ratten-Mesangialzellen untersucht. Sie haben gefunden, dass Renin eine ERK-Phosphorylierung induziert und diese eine Hochregulation der TGFbeta- und PAI-mRNA-Expression bewirkt [30, 31]. Bei Vorinkubation mit einem ACE-Inhibitor oder einem AT1R-Blocker wird die Renin-induzierte ERK-Phosphorylierung nicht abgeschwächt, was gegen eine Beteiligung der AngiotensinII/AT1R-Wechselwirkung an der ERK-Phosphorylierung spricht [30]. Weiter haben sie gezeigt, dass die Renin-induzierte ERK-Phosphorylierung durch den (P)RR bedingt ist, indem sie Ratten-Mesangialzellen mit einer siRNA, die gegen das Ratten-(P)RR-Gen gerichtet ist, transfiziert haben. Nach Stimulation dieser Zellen mit Renin kann neben einer starken Herunterregulation der (P)RR-mRNA-Expression eine Abschwächung der ERK-Aktivierung auf Basalniveau nachgewiesen werden [30].

8.4 Wirkungen von Aliskiren in vivo

Die Unterdrückung des RAS in vivo nach Behandlung mit ACE-Inhibitoren oder AT1R-Blockern bleibt unvollständig [61]. Der Grund dafür ist, dass diese Therapien einen reaktiven Anstieg der Reninaktivität bewirken [62], da sie die kurze Feedback-Schleife zerstören, durch welche Angiotensin II normalerweise die weitere Freisetzung von Renin aus der Niere hemmt [63]. Der reaktive Anstieg in der Plasma-Renin-Aktivität durch ACE-Inhibitoren oder AT1-Blocker gibt Anlaß zu vielen Erklärungen auf die Frage, warum gegenwärtige RAS-Inhibitoren manchmal nicht optimal wirksam sind. Bei der Anwendung von ACE-Inhibitoren könnte der reaktive Anstieg der Plasma-Renin-Aktivität zur erhöhten Angiotensin II-Bildung durch ACE-unabhängige Wege führen, wie z. B. durch Dipeptidasen, welche in mehreren

Gewebe, einschließlich der Niere, gefunden worden sind [64]. Der langsame Anstieg von Angiotensin II unter ACE-Blocker-Behandlung wird als „ACE escape“ bezeichnet [61]. Klinische Studien haben bestätigt, dass dieses Phänomen assoziiert ist mit verschlechterter Blutdruckkontrolle bei Hypertoniepatienten [65] und mit schlechterer Prognose für Patienten mit Herzinsuffizienz [66]. Die gesteigerte PRA könnte auch Effekte bedingen, die von AT1-Rezeptor unabhängig sind. Erhöhtes Angiotensin II nach AT1R-Blockade könnte z. B. auch zur AT2R-Aktivierung führen. Während einige präklinische Studien gezeigt haben, dass AT2R-Aktivierung mit protektiven Wirkungen, wie Vasodilatation und Hemmung der Reninfreisetzung, assoziiert ist [67], haben andere Studien gezeigt, dass AT2R-bedingte Signalwege zu Schädigungen, wie vaskuläre Zellproliferation, führen [68].

Im Gegensatz zu ACE-Blockern und AT1R-Blockern neutralisieren Renininhibitoren alle kompensatorischen Anstiege in der PRA und verhindern die Bildung von Angiotensin I und II. Obwohl schon viele Renininhibitoren entwickelt worden sind, haben die geringe Bioverfügbarkeit und die ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Substanzen verhindert, dass sie zur klinischen Anwendung gekommen sind. Aliskiren ist der erste wirksame Renininhibitor zur Behandlung der Hypertonie. Nussberger et al haben Aliskiren in gesunden Probanden untersucht und gefunden, dass das Medikament eine Dosis-abhängige und lang anhaltende Erniedrigung der Aldosteron- und Angiotensin II-Konzentrationen bewirkt [69]. Stanton et al haben vier Dosen von Aliskiren bis zu 300 mg/Tag an Patienten mit leichter bis mittelstarker Hypertonie untersucht [40]. Grandmann et al haben gefunden, dass die einmal tägliche Gabe von Aliskiren den Blutdruck wirksam senkt mit einem Nebenwirkungsprofil und einer Sicherheit vergleichbar mit Irbesartan und Placebo bei Patienten mit leichter bis mittelstarker Hypertonie [70]. Azizi et al haben Aliskiren in Kombination mit Valsartan untersucht. Aliskiren 150 mg und Valsartan 80 mg steigern nicht die PRA oder Plasma-Angiotensin-Spiegel, obwohl die Plasma-Reninkonzentrationen erhöht sind. Der Renininhibitor unterdrückt den Anstieg der Reninaktivität, der normalerweise durch einen AT1R-Blocker stimuliert wird [71].

Präklinische Studien zu Renininhibitoren und Organschäden sind in verschiedenen Tiermodellen durchgeführt worden. Die Spezifität von Renin bewirkt, dass ein humaner Renininhibitor nur in Affen, Meerschweinchen und mit Einschränkung in Mäusen getestet werden kann. Um dieses Problem der Spezifität zu lösen, haben Ganten, Mullins, Murakami und andere zwei transgene Rattenstämme entwickelt [44]. Ein Stamm besitzt das humane Renin-Gen mit seinem eigenen Promotor, der zweite Stamm besitzt humanes Angiotensinogen-Gen mit einem Albuminpromotor. Ratten-Renin spaltet kein

humanes Angiotensinogen, und humanes Renin spaltet kein Ratten-Angiotensinogen. Die Kreuzung beider Stämme führt zur doppelt-transenen Ratte (dTGR). Diese Ratte trägt beide Transgene und bildet große Mengen Angiotensin II in der Zirkulation, der Gefäßmuskulatur, im Herzen und in den Nieren. Unbehandelt sterben diese Ratten an Herzschwäche und Nierenversagen nach 7-8 Wochen. Das Modell ist ideal, um humane Renininhibitoren zu testen und eignet sich zur Untersuchung der Mechanismen des Zielorganschadens und deren Reparatur. Hier werden die Tiere von der 4. bis zur 7. Lebenswoche untersucht. Unbehandelte dTGR haben hohen Blutdruck, erhöhte Serum-Cystatin C-Werte und Albuminurie in der 7. Woche. Aliskiren kann den Blutdruck senken und den Nierenschaden in dTGR stark verbessern, sogar nachdem der Organschaden und die Hypertonie bereits manifest sind. Aliskiren verbessert die Albuminurie nicht nur, sondern kehrt sie um. Außerdem normalisiert die Aliskiren-Behandlung Serum-Cystatin C-Werte und die Ratten-Ngal-mRNA-Expression und damit die GFR und den Tubulusschaden. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits in früheren Untersuchungen gezeigt, dass Aliskiren die renale Fibrose, die kardiale Hypertrophie und die diastolische Dysfunktion in dTGR verbessert [50]. In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Komplementexpression (C1q, C3, C3c und C5b-9-Expression) und die C-reaktive Protein-Expression, die Makrophagen- und T-Zellen-Infiltrationen und eine Hochregulation von TNF α dem Auftreten der Albuminurie in dTGR vorausgehen. C1q, C3, C3c und C5b-9 werden in der Media der dTGR-Gefäße nachgewiesen. C5b-9 kolokalisiert mit IL-6. Aliskiren und auch der AT1-Blocker Losartan reduzieren Albuminurie, TNF α , CRP und Komplementexpression auf Kontrollwerte [43]. Die Erkenntnisse im Angiotensin II-abhängigen dTGR-Modell deuten darauf hin, dass Komplementaktivierung eine Rolle spielt für die Entwicklung des Organschadens. TNF α und CRP bedingen die Komplementinduktion. Die Blockade des RAS durch einen Renininhibitor verbessert den Zielorganschaden in diesem Modell.

Eine adequate RAS-Blockade kann mit ACE-Hemmern oder AT1-Blockern wegen gegenregulatorischer Mechanismen nicht immer erreicht werden. Mit Hilfe von Renininhibitoren kann nun der primär limitierende Schritt im RAS pharmakologisch gehemmt werden. Aliskiren führt in präklinischen Studien zur Verbesserung des Angiotensin II induzierten renalen und kardialen Schadens. Klinische Studien, die die Wirkungen von Aliskiren auf den Zielorganschaden in diabetischen Patienten untersuchen, laufen momentan noch, aber die Ergebnisse, die mit Renininhibitoren in Tiermodellen mit Organschäden erhalten worden sind, lassen vermuten, dass diese Substanzklasse großes Potential besitzt.

Vor kurzem veröffentlichte Studien deuten an, dass PRA ein Prediktor für kardiovaskuläres Risiko ist. Eine Studie mit 2902 hypertensiven Patienten zeigt, dass PRA unabhängig und direkt assoziiert ist mit dem Risiko für Myokardinfarkt, obwohl die Patienten mit einer antihypertensiven Therapie eine Blutdruckkontrolle erreicht haben [72]. Obwohl diese Beobachtungen wahrscheinlich zumindest teilweise durch erhöhtes Angiotensin II bedingt sind, könnten Renin und Prorenin auch direkt das kardiovaskuläre Risiko durch verstärkte Stimulation des neu entdeckten (P)RR steigern.

Der (P)RR könnte auch wichtig sein für die vaskuläre Aufnahme und Aktivierung von (Pro)renin und dadurch zur lokalen Bildung von Angiotensin II führen. Burcklé et al haben eine transgene Ratte, die das menschliche (P)RR-Gen in glatten Muskelzellen unter der Kontrolle eines 15-kb-Fragments des Maus-glatte Muskel-Myosin heavy chain Gens (TGR(SMMHC-HRR)) überexprimiert, entwickelt. Im Alter von 6 Monaten entwickelten diese Ratten einen kardiovaskulären Phänotyp mit erhöhtem systolischen Blutdruck und gesteigerter Herzfrequenz. Diese Veränderungen schreiten mit dem Alter fort. Obwohl die Nierenfunktion und Plasma-Renin in diesen transgenen Tieren normal ist, steigt die Plasmaaldosteronkonzentration und das Aldosteron/Renin-Verhältnis [73]. Das lässt vermuten, dass (P)RR-Überexpression zu gesteigerten intraadrenalen Angiotensin II-Konzentrationen führt und dadurch gesteigerte Aldosteronbildung in Abwesenheit von Änderungen im Plasmaprenin bewirkt. Der Aldosteronanstieg könnte zumindest teilweise für den beobachteten kardiovaskulären Phänotyp verantwortlich sein.

8.5 Wirkungen von Aliskiren in vitro

Durch die Bindung von (Pro)renin an den (P)RR werden Renin und Prorenin enzymatisch aktiviert und können AOPEN binden. Diese Funktion des (P)RR scheint auch durch Aliskiren gehemmt zu werden, da Aliskiren vor kardialen und renalen Endorganschaden in dem hier präsentierten dTGR-Modell schützt. Das könnte durch eine sofortige Bindung von Aliskiren anstelle von AOPEN an das aktive Zentrum von (P)RR gebundenem Renin oder Prorenin erklärt werden. In diesem Zusammenhang stellt sich in dieser Arbeit die Frage, ob Aliskiren auch die durch (Pro)renin/(P)RR-Wechselwirkung bedingte ERK-Phosphorylierung hemmt und damit Einfluß auf die zweite Funktion des (P)RR, nämlich auf die RAS-unabhängige Signaltransduktion hat und so auch ein (P)RR-Blocker ist. Die Hypothese ist, dass Renin oder Prorenin durch die Bindung an Aliskiren eine so starke Konformationsänderung erfahren, dass sie nicht mehr an den (P)RR binden können. Es kann hier gezeigt werden, dass Aliskiren neben der Hemmung der enzymatischen Aktivität von (Pro)renin, nicht in der Lage ist, die

Renin- und Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung *in vitro* zu hemmen. Eine aktuelle Studie zeigt, dass Aliskiren auch die PLZF-vermittelte Signalkaskade nicht hemmt [74]. Weiter kann Aliskiren auch das radioaktive Binding von Renin oder Prorenin an den (P)RR nicht hemmen [75]. Aliskiren ist also ein reiner Renininhibitor und kein (P)RR-Blocker. Damit ist nicht ausgeschlossen, dass der Anstieg in der Plasma-Reninkonzentration, der bei Patienten unter Aliskirenbehandlung beobachtet wird, zu einer verstärkten Renin/(P)RR-Wechselwirkung und Signaltransduktion führt und assoziiert sein könnte mit Nebenwirkungen auf kardiovaskuläre Organe. Die Existenz und Bedeutung von diesem Mechanismus *in vivo* muß allerdings noch herausgefunden werden.

8.6 HRP, ein spezifischer (P)RR-Blocker

8.6.1 Prorenin-Aktivierung

Prorenin wird aus den Nieren freigesetzt und seine Konzentration im Plasma ist viel höher als die Konzentration von Renin. Anders als bei anderen Proteasen kommt es nicht zur Selbstaktivierung von Prorenin im Plasma. Der einheitliche Reifungsort von Prorenin zu Renin sind die Myoepitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparats, wo das Prosegment von Renin durch eine Prokonvertase abgespalten wird. *In vitro* ist gefunden worden, dass Prorenin durch Säure und Kälte nichtproteolytisch aktiviert wird. Für *in vivo* Verhältnisse ist eine Kryoaktivierung nicht relevant. Es bleibt zu prüfen, ob Säureaktivierung im Körper bei der Umwandlung von Prorenin zu Renin in den interkallierenden Zellen der Niere eine Rolle spielt. Luetscher et al haben gefunden, dass Patienten mit Diabetes und Endorganschaden viel höhere Prorenin-Spiegel aufweisen als Gesunde. Hohe Proreninspiegel und nicht PRA waren mit dem Schweregrad der diabetischen Komplikationen in diesen Patienten assoziiert. Der (P)RR stellt eine Möglichkeit für Proreninaktivierung *in vivo* dar. Die Aktivierung von (P)RR-gebundenem Prorenin ist bedingt durch eine Konformationsänderung, die dann wahrscheinlich das Herausfallen des Prosegments bewirkt. Das wiederum ermöglicht den Zugang des Substrats AOPEN zum enzymatischen Spalt. Dieses Phänomen bezeichnet man als nichtproteolytische Aktivierung im Gegensatz zur proteolytischen Aktivierung von Prorenin, bei welcher das Prosegment abgespalten wird und Renin entsteht [76]. Gesteigerte Rezeptor-gebundene Aktivität von Renin und nichtproteolytische Aktivierung von Rezeptor-gebundenem Prorenin ist bestätigt worden durch Experimente mit rekombinanten Ratten-(P)RR und Prorenin [77]. Kurz nachdem beobachtet wurde, dass (P)RR-gebundenes Prorenin voll enzymatisch aktiv ist, haben Suzuki et al eine ähnliche nichtproteolytische Aktivierung

von Prorenin durch Bindung der Handle Region des Prosegments von Prorenin an einen Antikörper beobachtet [8]. Sie schlagen vor, dass die Bindung der Handle-Region ($I^{11P}FLKR^{15P}$) durch den Antikörper die Dissoziation der Gate-Region ($T^{7P}FKR^{10P}$) provoziert, die den aktiven Spalt bedeckt und Prorenin dadurch nichtproteolytisch aktiviert wird.

8.6.2 HRP verbessert den Organschaden in vielen Tiermodellen

Basierend auf diesen Beobachtungen haben Ichihara et al die Hypothese entwickelt, dass ein Peptid aus 10 Aminosäuren, das das Handle-Region Peptid (HRP) darstellt, die Proreninbindung an den (P)RR und die nachfolgende Angiotensin II-Bildung und ERK-Aktivierung hemmen kann. Die ersten Versuche kardialen und renalen Schaden durch Hypertonie und Diabetes mit HRP zu behandeln, haben zu beeindruckenden Ergebnissen geführt.

In Ratten, die mit Streptozotocin diabetisch gemacht worden sind, sind die renalen Angiotensin I und II-Spiegel im Vergleich zu nichtdiabetischen Kontrolltieren erhöht. Dagegen sind renales Renin und AOPEN unverändert. Eine Behandlung mit HRP senkt die renalen Angiotensin I und II-Spiegel und hemmt die Entwicklung der diabetischen Nephropathie, ohne die Hyperglykämie zu beeinflussen. Die Proteinausscheidung im Urin und die Glomerulosklerose in den diabetischen Ratten werden durch die HRP-Behandlung vollständig gehemmt. Ichihara et al spekulieren, dass HRP die Prorenin-Aktivierung durch Hemmung der Proreninbindung an den (P)RR senkt. Da der (P)RR nur im Gewebe und nicht in der Zirkulation vorkommt, wirkt HRP nur auf das lokale RAS, aber nicht auf die zirkulierende Reninaktivität oder zirkulierende Angiotensin I und II-Spiegel. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu früheren Publikationen von Danser et al, die zeigen, dass zirkulierendes Angiotensin II von lokaler Synthese abhängt [17]. Die Entwicklung der diabetischen Nephropathie ist verbunden mit aktiviertem Nieren-RAS und die nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin trägt laut dieser Studie zur Aktivierung des Nieren-RAS und zur Entwicklung von diabetischer Nephropathie bei [33]. Substanzen, die die nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin hemmen, könnten demnach eine Therapiemöglichkeit sein, diabetischen Organschaden zu verhindern.

Weiter haben Ichihara et al in spontan hypertensiven Ratten (SHR) gezeigt, dass HRP renalen und kardialen Schaden durch die Hemmung der nichtproteolytischen Aktivierung von Prorenin und der damit verbundenen Hemmung der renalen und kardialen RAS-Aktivität verbessert. Auch in SHR-Ratten hat HRP keinen Einfluss auf das zirkulierende RAS und den

Blutdruck. In den Nieren kommt es zur signifikanten Abschwächung der Entwicklung und des Fortschreitens von Proteinurie und Glomerulosklerose [35]. Im Herzen werden Fibrose, Ventrikelgröße und Herzgewicht verringert [36]. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben aber gezeigt, dass Renin renalen Ursprungs sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen verantwortlich ist für die Bildung von kardialen Angiotensin I und II. Entsprechend kommt es nach bilateraler Nephrektomie zur Erniedrigung der kardialen Renin-, Angiotensin I- und II-Spiegel parallel mit einer Erniedrigung der Plasmaspiegel von diesen RAS-Komponenten.[18, 78-80]. In SHR-Ratten sind auch die Plasma-Reninspiegel erhöht und tragen zur verstärkten kardialen Angiotensin I und –II-bildung bei. Mit HRP wird nur die Proreninaktivierung gehemmt. Dadurch werden die kardialen Angiotensin I und –II-spiegel gesenkt. Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den anderen Untersuchungen, die ganz klar Renin eine Hauptrolle bei der kardialen Angiotensin I und –II-produktion zugestehen. Die erhöhten Reninspiegel in SHR-Ratten und die daraus resultierende kardiale RAS-Aktivierung werden von Ichihara et al außer Acht gelassen und nicht diskutiert.

Weiter beschreiben diese Autoren auch die Verhinderung der diabetischen Nephropathie durch HRP-Infusion in AT1a-ko-Mäuse, die mit Streptozotocin diabetisch gemacht worden sind. ACE-Hemmer-Behandlung bewirkt in diesem Modell keine Besserung des Nierenschadens. HRP-Behandlung ist in diesem Modell also einer ACE-Hemmer-Behandlung sogar überlegen. Durch die Wechselwirkung von Prorenin mit dem (P)RR kommt es zur Aktivierung der MAPKinasen p38, ERK und cJNK. Eine verstärkte Aktivierung des renalen RAS über Prorenin/(P)RR-Wechselwirkung wird in diesem AT1a-Rezeptor-ko-Modell ausgeschlossen. Die renalen Schäden sollen also durch Angiotensin II unabhängige Prorenin/(P)RR-bedingte Signaltransduktion vermittelt werden und können durch HRP gehemmt werden.[33].

Diese Ergebnisse werfen viele Fragen auf und stehen im Widerspruch zu anderen veröffentlichten Daten.

Nguyen et al konnten zeigen, dass der (P)RR sowohl Renin als auch Prorenin bindet. Nach Ichihara et al bindet Prorenin mit dem Prosegment an den (P)RR. Dieses Konzept lässt also offen, wie Renin an den Rezeptor bindet. Weiter kann mit HRP nur die Proreninbindung an (P)RR verhindert werden. Daraus folgt, dass Renin weiterhin an den (P)RR binden kann und laut Nguyen et al die katalytische Aktivität von Renin um das 3-5fache gesteigert wird. Damit ist nicht schlüssig, warum HRP in Modellen wie SHR, in denen hohe Reninkonzentrationen

vorhanden sind, die gesamte Rezeptoraktivität hemmen kann und den Organschaden so stark verbessert. Für eine Bindung von Renin an den (P)RR und dadurch bedingte zelluläre Wirkungen sprechen auch die Ergebnisse von Huang et al., die eine spezifische Renin-bedingte Signaltransduktion in vitro nachgewiesen haben [30, 31]. Die in dieser Arbeit präsentierten in vitro-Ergebnisse zeigen, dass ERK-Aktivierung auftritt, wenn der (P)RR mit Renin oder Prorenin in Wechselwirkung tritt. Eine alternative Erklärung ist, dass Renin einen Bindungsort zum (P)RR innerhalb des Reninmoleküls hat [77]. Dann bleibt allerdings die Frage, wie HRP diese Interaktion hemmen kann.

Keine der Studien von Ichiharas Gruppe zeigt, dass HRP die (Pro)reninbindung in vitro spezifisch hemmt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass FITC-gelabeltes HRP an U937-Zellen bindet. Diese Bindung ist konzentrationsabhängig und kompetitiv. In radioaktiven Bindungsexperimenten mit Renin und Prorenin an U937-Zellen hat HRP keinen Einfluß auf diese Bindung. Außerdem ist FITC-HRP in der Lage an embryonale Stammzellen zu binden, die die Transmembrandomäne für (P)RR nicht tragen. In Western blot-Versuchen kann HRP weder Renin- noch Prorenin-vermittelte ERK-Phosphorylierung hemmen. Diese in vitro-Ergebnisse deuten nicht daraufhin, dass HRP ein spezifischer (P)RR-Antagonist ist. Es könnte sein, dass die Wirksamkeit von HRP in vivo von einem noch nicht aufgeklärten Wirkungsmechanismus abhängt, aber nicht vom kompetitiven Antagonismus zum (P)RR.

In dieser Arbeit wird der Einfluß von HRP auf Mortalität, Blutdruck und Nierenschaden in dTGR untersucht. Die dTGR haben 3-5fach gesteigerte zirkulierende und Gewebe-Angiotensin II-Spiegel und hohe zirkulierende humane Renin- und Proreninspiegel. Sie entwickeln Bluthochdruck, kardialen und renalen Schaden und sterben in der 7. Lebenswoche [47, 48]. HRP führt zu keiner Verbesserung der Sterblichkeit, des Blutdrucks und des renalen Schadens in diesem Modell. Wir haben dieselben Sequenzen verwendet, die von Ichihara veröffentlicht wurde. Da die von Ichihara empfohlene Dosierung von HRP sehr niedrig ist, haben wir auch 30fach höhere HRP-Dosen in den Minipumpen verwendet, aber haben auch damit keinen schützenden Effekt auf die Niere nachgewiesen. Ichihara zeigt beeindruckende Ergebnisse in einem diabetischen Modell mit Nephropathie [34]. Diese Tiere weisen hohe Proreninspiegel auf und niedrige PRA. Unser Rattenmodell ist ganz klar anders. Die frühere Charakterisierung des dTGR-Modells ergab Angiotensin II-Konzentrationen von 100 pg/ml, humane PRA-Werte von 60 ng Angiotensin I/ml pro Stunde und humane AOPEN-Spiegel von ungefähr 40 µg Angiotensin I/ml. Renale Angiotensin II-Konzentrationen waren fast 80 pg/g Gewebe, ungefähr 4fach höher als in SD-Kontrollen. Das Verhältnis von menschlichem Prorenin zu Renin in diesem Modell ist ungefähr 10:1 [81]. Ein weiteres Problem im dTGR-

Modell könnte die nicht berücksichtigt Spezies-Spezifität sein. Diese soll zwar nach Ichihara et al für die Bindung von Renin oder Prorenin an den (P)RR nicht wichtig sein [38], einen Beweis dafür gibt es aber nicht.

Um das eventuelle Problem der Speziespezifität zu umgehen, ist die Wirkung von HRP in vivo in renovaskulären hypertensiven Goldblatt-Ratten untersucht worden [82]. Chronische Behandlung mit HRP verbessert den Zielorganschaden auch in diesen Ratten nicht. 2K1C-Ratten entwickeln hohe Renin- und Proreninspiegel und erhöhte PRA, die zu Angiotensin II-abhängigem Organschaden führt. Renin ist ab der 4. Woche nach dem Clipping erhöht und der Organschaden entwickelt sich in der zweiten 2-Wochen-Periode. Es wird angenommen, dass eine Behandlung mit HRP durch (P)RR-Blockade diese Mechanismen inhibieren und zu einer Verbesserung des Organschadens führt. Es könnte sein, dass längere Behandlungsperioden notwendig sind, um den vorhandenen Schaden zu verbessern. Jedoch zeigen die Untersuchungen in diesen beiden Modellen wie auch die Ergebnisse von Krebs et al sowie unveröffentlichte Daten von Mullins et al (VK) und Reudelhuber (LA), dass das Konzept der HRP-(P)RR-Hemmung weiterer Aufklärung bedarf.

Nichtproteolytische Aktivierung von Prorenin, lokale kardiale und renale Angiotensin II-Bildung und direkte (P)RR-vermittelte MAPK-Aktivierung sollten abgeschwächt sein nach HRP-Behandlung. Die in vitro-Ergebnisse zeigen, dass HRP-Bindung nicht an den (P)RR erfolgt. Alle in vivo und in vitro Ergebnisse zur Anwendung von HRP stellen den Gebrauch von HRP als einen (P)RR-Blocker in Frage, obwohl Ichihara et al viele Studien präsentiert haben, wo HRP-Behandlung die Nephropathie verbessert.

Diabetische Komplikationen korrelieren mit hohen Proreninspiegeln und nicht mit erhöhter PRA, was Prorenin im Gegensatz zu Renin eine ausschließliche Rolle bei Diabetes zugesteht [39, 83]. In diabetischen Patienten und in diabetischen Ratten und Mäusen sind hohe Prorenin- und niedrige Reninspiegel die Regel. Im Gegensatz dazu sind renovaskuläre hypertensive Ratten, wie 2K1C-Ratten [84-86] und dTGR [81], durch hohe Renin- und Proreninspiegel charakterisiert. Renin und Prorenin binden an den (P)RR und bedingen die Rezeptorwirkungen [24]. Da HRP aus einer 10-Aminosäure-Sequenz des Prosegments von Prorenin besteht, bleibt die Frage, wie diese Sequenz als ein kompetitiver Rezeptorblocker für Renin wirken kann, welches das Prosegment nicht trägt. Ob ein hohes Prorenin zu Renin-Verhältnis die Wirkungen von HRP bedingt, ist spekulativ. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass HRP ein Blocker für Prorenin in Situationen ist, wo Prorenin erhöht, aber Renin und Angiotensin I und II erniedrigt oder unverändert sind. Aber die Daten von Ichihara et al in SHR Ratten sprechen gegen diese Hypothese [36]. Auch Susic et al haben SHR mit HRP

behandelt. Sie beschreiben eine Verbesserung der linksventrikulären Hypertrophie. HRP führt aber zu keiner Verminderung der Kollagenablagerung im Myokard, zu keiner Verbesserung der linksventrikulären Funktion und der kardialen und renalen Hämodynamik im SHR-Modell [87].

Batenburg et al haben in Ratten-VSMC, die den humanen (P)RR überexprimieren, gezeigt, dass der humane (P)RR bevorzugt Prorenin bindet [88]. Da die Bindung mit niedriger Affinität erfolgt, kommt es wahrscheinlich nur zur (P)RR-abhängigen Angiotensin II-Bildung, wenn die Proreninspiegel ausreichend hoch sind, also in vivo nur in Geweben, die Prorenin lokal bilden, wie in Nieren, Nebennieren, Ovarien, Testes und Augen [89-92]. Das könnte erklären, warum HRP die renalen, aber nicht die zirkulierenden Angiotensin II-Spiegel in vivo in Ratten reduziert [34] und warum humane (P)RR-Überexpression zur Glomerulosklerose und erhöhten Aldosteron-Spiegeln führt [37, 38, 73]. Humanes HRP kann aber auch in dieser Studie die Angiotensin I-Bildung durch Prorenin und AOPEN in normalen VSMC und in VSMC, die humanen (P)RR überexprimieren, nicht hemmen.

Wahrscheinlich hängt die Wirksamkeit von HRP in vivo von einem noch nicht aufgeklärten Mechanismus ab. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass diese Wirksamkeit aber nicht durch einen kompetitiven Antagonismus zum (P)RR bedingt ist.

8.7 mRNA-Expression des (P)RR

Scheffé et al haben gezeigt, dass die Expression des (P)RR durch die Stimulation mit Renin in menschlichen Nieren und in Ratten-Kardiomyoblastenzelllinien negativ reguliert wird. Sie haben promyelozytisches Zinkfinger-Protein (PLZF) als direkten Interaktionspartner des (P)RR identifiziert. Nach der Aktivierung des (P)RR durch Renin wird PLZF in den Zellkern transportiert und unterdrückt die Transkription des (P)RR auf Promoter- und mRNA-Ebene im Sinne einer kleinen negativen Feedback-Schleife. Simultan mit der Aktivierung von (P)RR durch Renin wird auch die Promotoraktivität und Transkription von einem zweiten Zielgen, der p85 α -Untereinheit von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K-p85 α) erhöht. Dieses Protein ist beteiligt an der Stimulation der Proteinsynthese und kardialen Hypertrophie. Der neue (P)RR-PLZF-PI3K-Signaltransduktionsweg induziert in Rattenkardiomyoblasten einen Anstieg der Proliferation und einen Rückgang in der apoptotischen Aktivität. In einer weiteren Studie haben Scheffé et al gezeigt, dass auch die Stimulation von HEK293-Zellen mit Prorenin zur Herunterregulation der (P)RR-mRNA und zur gleichzeitigen Hochregulation der PI3K-p85 α -mRNA führt. Weiter steigert auch Proreninstimulation die Proliferation.

In den hier für in vitro-Versuche verwendeten U937-Zellen und CASMC wird der (P)RR gut exprimiert. Die Expression in U937-Zellen ist etwas höher als in CASMC. Nach Stimulation der Zellen mit Renin oder Prorenin wird keine mRNA-Expressionsänderung des (P)RR-Gens gefunden. In vivo wird die (P)RR-mRNA-Expression in Herz, Leber und Niere von jeweils TGR(hRen), dTGR und SD-Ratten in der 7. Lebenswoche und in Herz und Fettgewebe von jeweils TGR(hRen) und SD-Ratten in der 21. Lebenswoche verglichen. In der 7. Lebenswoche ist (P)RR-Gen in den Rattennieren am höchsten exprimiert. In Herz und Leber sind verhältnismäßig viel geringere Expressionen nachweisbar (ungefähr 10fach geringere Expressionen als in der Niere). Es ist bereits bekannt, dass der (P)RR vor der Geburt in allen Geweben hoch exprimiert wird. Nach der Geburt sinkt die Expression in vielen Geweben stark ab. Nur in Niere, Gehirn und Intestinaltrakt bleibt die Expression auch nach der Geburt hoch (persönliche Mitteilung von G. Nguyen). Eine entsprechend hohe Expression in der Rattenniere kann auch für TGR(hRen) in dieser Arbeit bestätigt werden.

Beim Vergleich der (P)RR-Expressionen in dTGR, TGR(hRen) und SD-Ratten kann zum Zeitpunkt 7. Lebenswoche in der Rattenniere eine Herunterregulation des (P)RR-Gens in TGR(hRen), die nur humanes Renin exprimieren und keinen Organschaden zeigen, und in Herzen eine Hochregulation des (P)RR-Gens in TGR(hRen) und dTGR im Vergleich zu SD-Ratten nachgewiesen werden. Weiter wird gefunden, dass der (P)RR in der Gesamtniere von dTGR (7. Woche) gegenüber SD-Ratten auf mRNA-Niveau nicht reguliert ist, aber bei separater Untersuchung in den Glomeruli eine entsprechende Herunterregulation des (P)RR-Gens nachgewiesen werden kann. In der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen ist die mRNA-Expression dagegen in diesem Modell gegenüber SD-Ratten nicht reguliert. Somit können die Ergebnisse zur (P)RR-Regulation von Scheffé et al für den Expressionsvergleich nur in TGR(hRen)-Rattennieren und dTGR-Glomeruli bestätigt werden. Das deutet darauf hin, dass für die (P)RR-Regulation in vivo auch andere Faktoren von Bedeutung sein müssen. Für die PI3Kp85 α -mRNA kann keine entsprechende Hochregulation für die TGR(hRen)-Rattennieren gefunden werden. In Glomeruli wird keine Regulation der PI3Kp85 α -Untereinheit und in der tubulointerstitiellen Fraktion und Gefäßen eine leichte Hochregulation der Untereinheit gefunden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der in vitro für bestimmte Zelltypen gültige Mechanismus der Herunterregulation des (P)RR-Gens unter Hochreninbedingungen nach Scheffé et al. für die in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen und in vielen hier untersuchten Geweben der komplizierteren in vivo Modelle nicht bestätigt werden kann. Weiter geht eine Herunterregulation des (P)RR-Gens in den hier untersuchten Geweben nicht mit einer

Hochregulation der mRNA für p85 α -Untereinheit der PI3K einher. Der in vitro in bestimmten Zelltypen von Scheffe et al nachgewiesene Mechanismus scheint also Zelltyp-spezifisch zu sein. Weiter lässt dieser Mechanismus sich nicht einfach auf komplexere in vivo Situationen wie in den Hochrenin-Tiermodellen übertragen.

Auch Krebs et al haben die (P)RR-Expression unter Hochreninbedingungen in vivo in der geklippten Niere der Goldblatt-hypertensiven Ratten untersucht. Sie haben diese Ratten mit dem Vasopeptidase-Inhibitor AVE7688 behandelt. Diese Behandlung senkt den Blutdruck, führt aber gleichzeitig zum Anstieg der intestinalen Fibrose in der geklippten Niere. RT-PCR-Ergebnisse zeigen, dass renale Renin-mRNA in der geklippten Niere hochreguliert ist. Die Blutdrucksenkung mit dem Vasopeptidase-Inhibitor in diesen Ratten bewirkt einen weiteren Anstieg der Renin-mRNA in der geklippten Niere. Parallel dazu ist die (P)RR-Expression in der geklippten Niere auch hochreguliert. Die Autoren haben untersucht, ob diese Regulation der mRNA-Expressionen spezifisch ist für die geklippte Niere und haben die entsprechenden mRNA-Expressionen von renalem (Pro)renin und (P)RR in gesunden normotensiven Ratten, die 6 Wochen mit Vasopeptidase-Inhibitor behandelt wurden, ermittelt. Die renale Renin-mRNA-Expression steigt auch hier stark an, aber die (P)RR-mRNA-Expression wird im Vergleich zu unbehandelten normotensiven Ratten erniedrigt. Die Autoren schlussfolgern, dass (P)RR unter physiologischen Bedingungen in Anwesenheit von hohen Reninkonzentrationen herunterreguliert wird und die Hochregulation des (P)RR unter Hochreninbedingungen in der geklippten Niere spezifisch für Goldblatt-Hypertonie und kein allgemeingültiger Mechanismus ist [86].

Die Herunterregulation des (P)RR unter Hochreninbedingungen könnte vielleicht ein Schutzmechanismus sein. Auch in den hier untersuchten TGR(hRen) ist eine Herunterregulation des Ratten-(P)RR in Rattennieren unter Hochreninbedingungen nachweisbar und die Niere scheint gleichzeitig vor Schaden geschützt zu sein, da wir keine Hinweise auf Schäden in den Nieren der TGR(hRen) finden. Kontrovers sind auch die Ergebnisse zur (P)RR-mRNA-Regulation bei Fibrose mit Hochregulation von TGFbeta1. Huang et al haben gezeigt, dass nach Stimulation von Ratten-Mesangialzellen mit steigenden Konzentrationen von rekombinanten Ratten-Renin die Ratten-TGFbeta1-mRNA-Expression steigt. Weiter kommt es zu einer gesteigerten Expression von Ratten-Fibronektin und Ratten-Kollagen. (P)RR-mRNA-Expression bleibt durch die Stimulation mit rekombinanten Ratten-Renin unverändert. Sie haben aber durch ein siRNA-Experiment gezeigt, dass die gesteigerte Expression von Ratten-TGFbeta1 durch (P)RR bedingt ist [30, 31, 36]. In dieser Arbeit kann eine um Faktor 2 erhöhte Ratten-(P)RR-mRNA-Expression in TGR(hRen) im Vergleich zu

SD-Ratten in Rattenherzen der 7. Lebenswoche nachgewiesen werden, die mit einer Hochregulation von Ratten-TGFbeta1-Gen und einer leichten Fibrose assoziiert ist. Beim Vergleich der (P)RR-Expression von TGR(hRen) der 7. und 21. Lebenswoche fällt auf, dass die (P)RR-mRNA-Expression über diesen Zeitraum wieder auf SD-Niveau absinkt. Möglicherweise stellt der (P)RR in diesem Tiermodell einen Aufnahmemechanismus für (Pro)renin in das Rattenherz dar.

Ab der 21. Lebenswoche kann man bei den TGR(hRen) eine starke Gewichtszunahme beobachten. Daher haben wir die mRNA-Expression von Ratten-(P)RR und verschiedener Kandidatengene im Fettgewebe untersucht. Ratten-(P)RR ist gegenüber altersgleichen nichttransgenen SD-Ratten in der 20. Lebenswoche nicht reguliert. In den TGR(hRen) sind die mRNA-Expressionswerte für Ratten-Leptin im Fettgewebe und die Proteinexpressionswerte im Serum (unveröffentlichte Daten) gegenüber SD-Ratten erhöht. Bei freiem Zugang zum Futter fressen TGR(hRen) mehr als altersgleiche nicht fettleibige SD-Ratten. Gesteigerte Nahrungsaufnahme und Leptinresistenz deuten eine Störung des Appetitverhaltens an. In der Zukunft soll untersucht werden, ob der (P)RR in diesem Prozeß eine Rolle spielt und dazu unter anderem die Ratten-(P)RR-Expression in verschiedenen Regionen des Rattengehirns untersucht werden.

Der Mangel unseres TGR(hRen)-Modells liegt in der fehlenden Speziespezifität. Wir gehen davon aus, dass der Ratten-(P)RR auch humanes Renin binden kann. Durch diese angenommene Bindung kommt es nicht zur Aktivierung des klassischen RAS mit einer vermehrten Angiotensin II-Bildung. In Übereinstimmung damit bestätigen unsere Experimente mit humanem (P)RR in Maus-VSMC die These von Ichihara et al, dass die Signaltransduktion kein speziesspezifischer Vorgang ist. [38].

Die bisherigen Ergebnisse zur (P)RR-mRNA-Expression zeigen, daß Unterschiede in der (P)RR-mRNA-Expression in Abhängigkeit vom Zelltyp in vitro und vom Tiermodell in vivo auftreten. Innerhalb eines Tiermodells können in den verschiedenen Organen unterschiedliche mRNA-Expressionen nachgewiesen werden. Außerdem spielt die (Pro)reninkonzentration für die mRNA-Expression des (P)RR eine Rolle. Wie durch unterschiedliche (P)RR-mRNA-Expression die über (Pro)renin/(P)RR vermittelten Signalketten und die damit verbundenen zellulären Effekte beeinflusst werden, muß weiter untersucht werden.

9 Ausblick

(P)RR ist ein Transmembranprotein mit einer großen unglykosylierten und hoch hydrophoben N-terminalen Domäne und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz von ungefähr 20 Aminosäuren. Der N-terminale Teil des Proteins entspricht der extrazellulären Domäne und zeigt eine hohe Aminosäuresequenzidentität in Vertebraten. Im Gegensatz dazu ist der C-terminale Teil, der der Transmembranregion des (P)RR entspricht, konserviert in Vertebraten und Invertebraten. Das deutet auf eine unterschiedliche evolutionäre Entstehung der beiden Domänen hin. Der C-terminale Teil des (P)RR ist identisch mit dem M8-9-Protein, welches ein zum V-ATPase-Komplex assoziiertes Protein ist.

Die genaue Lokalisation des (P)RR ist noch nicht vollständig bekannt. Die Ergebnisse von Saris et al in Rattenkardiomyozyten und die Ergebnisse dieser Arbeit in U937-Zellen zeigen klar, dass der Hauptteil des Rezeptors intrazellulär gelegen ist und sich nur ein kleiner Anteil auf der Zelloberfläche befindet. Scheffe et al haben (P)RR perinuklär und im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen. Die intrazellulären Kompartimente, in denen (P)RR lokalisiert ist, müssen in der Zukunft weiter speiziert werden.

Eine Beteiligung von (P)RR in nicht kardiovaskulären Prozessen wird stark durch die folgende Beobachtung unterstützt. Wenn Murine embryonale Stammzellen, die den (P)RR nicht exprimieren, in die Blastozyste injiziert werden, bilden sich keine Chimeren. Das deutet auf eine essentielle Funktion des Proteins in Zellproliferation, Differenzierung und Überleben hin. Zebrafische mit Mutationen im (P)RR zeigen frühe Entwicklungsabnormalitäten, die besonders die Augen betreffen, zur Körperhypopigmentierung und zum neuronalen Zelltod führen. Sie sterben früh in der Entwicklung. Dieser Phänotyp ähnelt einem Phänotyp von anderen Zebrafischmutanten für die gut charakterisierten Untereinheiten der vakuolären Protonen-ATPase. Das unterstützt die Wechselwirkung von (P)RR mit diesem Komplex. Ramser et al haben eine Familie mit X-Chromosomen-gekoppelter mentaler Retardierung beschrieben. Die Mutation besteht in der Löschung von Exon 4 in (P)RR-mRNA, was zu einer Verkürzung des Proteins führt. Die Bindung von (Pro)renin an diesen mutierten Rezeptor und die Aktivierung des RAS bleibt unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu ist die p42/p44 MAP-Kinase-Aktivität beeinträchtigt. Wahrscheinlich ist dieser Defekt nicht die alleinige Ursache für die Erkrankung, aber die Beeinträchtigung der neuronalen Wirkungen des Proteins könnte die Pathologie miterklären.

Neben diesen nicht kardiovaskulären Funktionen des (P)RR führt eine Bindung von (Pro)renin an den (P)RR zu kardiovaskulären Wirkungen. So bedingt die Bindung von

(Pro)renin an (P)RR eine Aktivierung des RAS. Weiter kommt es durch diese Wechselwirkung zur Angiotensin II unabhängigen Induktion von TGFbeta 1 mit verstärkter Ablagerung von Matrixproteinen und damit zu fibrotischen Veränderungen. Durch Prorenin/(P)RR-Wechselwirkung konnte eine RAS-unabhängige erhöhte Proliferation von Kardiomyozyten gezeigt werden.

Bei der Einnahme von ACE-Hemmern, AT1R-Blockern und Renininhibitoren wird durch die fehlende negative Feedbackschleife eine starke Erhöhung der Reninkonzentration bewirkt. Bisher ist nicht bekannt, ob die erhöhten (Pro)reninkonzentrationen bei Einnahme dieser Medikamente in irgendeiner Weise schädlich sind. Im Zusammenhang mit der Entdeckung des (P)RR stellt sich die Frage, welche Wirkungen von einer (Pro)renin/(P)RR-Wechselwirkung ausgehen, ob diese Wirkungen unter kardiovaskulären Gesichtspunkten schädlich sind und die Entwicklung eines (P)RR-Blockers sinnvoll wäre. Falls in Untersuchungen in der Zukunft ungünstige kardiovaskuläre Wirkungen nachgewiesen werden würden, sollte im Hinblick auf die Synthese von (P)RR-Blockern berücksichtigt werden, dass der (P)RR neben kardiovaskulären Funktionen andere Aufgaben in Überleben und Differenzierung hat, die vielleicht nicht geblockt werden sollten. Ziel von zukünftigen Untersuchungen sollte eine genaue Aufklärung der Wirkungen der hohen Plasmapreninkonzentrationen auf das kardiovaskuläre System und eine genaue Aufklärung der Zellbiologie des (P)RR sein. In naher Zukunft werden konditionelle ko-Mäuse für (P)RR zur Verfügung stehen. Mit diesen Mäusen kann der (P)RR in unterschiedlichen Entwicklungsstufen und in verschiedenen Organen ausgeschaltet werden. Diese konditionellen ko-Mäuse für (P)RR werden in Zukunft helfen, die Funktionen des (P)RR bei kardiovaskulären Erkrankungen und in der Zellbiologie besser zu charakterisieren und die Frage nach dem Sinn eines (P)RR-Blockers zu beantworten.

10 Zusammenfassung

Der erst kürzlich beschriebene (P)RR ist ein neuer Transmembranrezeptor, der sowohl Renin als auch Prorenin bindet. Diese Bindung steigert die katalytische Aktivität von Renin um das Vier- bis Fünffache, aktiviert Prorenin nichtproteolytisch und vermittelt intrazellulär die Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2.

In dieser Doktorarbeit wird die Renin- und Prorenin-induzierte Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade über den (P)RR in U937-Zellen und CASMC untersucht. Diese Studie stellt den ersten Beweis zur Verfügung, dass Prorenin neben Renin eine ERK-Signaltransduktion unabhängig von Angiotensin II induzieren kann. Der (P)RR wird in U937-Zellen und in CASMC exprimiert. Stimulationen der Zellen mit Renin oder Prorenin haben keinen Einfluß auf dessen Genexpression. Die Renin- oder Prorenin-induzierte ERK-Phosphorylierung ist unabhängig von Angiotensin II. Dafür sprechen folgende Ergebnisse. Eine über AT1- oder AT2-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion durch Angiotensin II wird durch Vorinkubation der Zellen mit AT1R- und AT2R-Blocker vor der eigentlichen Stimulation mit Renin oder Prorenin ausgeschlossen. Außerdem kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch in AT1a-ko-Zellen Renin und Prorenin eine ERK-Phosphorylierung induzieren. Weiter ist in U937-Zellen der EGF-Rezeptor nicht beteiligt an der Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung. Auch dieses Ergebnis spricht gegen die Beteiligung von Angiotensin II an der (Pro)renin-vermittelten Signaltransduktion, da für eine Angiotensin II-vermittelte ERK-Phosphorylierung die Transaktivierung von EGF-Rezeptor notwendig ist. PKC α/β spielt keine Rolle in Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen in U937-Zellen. Dennoch sollte die Beteiligung der PKC in langandauernden Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen, wie sie in U937-Zellen nachweisbar sind, nicht ganz ausgeschlossen werden. Die Beteiligung von M6PR an der Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierung kann ausgeschlossen werden, da auch deglykosyliertes und damit an M6P-Rezeptor nicht mehr bindungsfähiges Renin zu einer ERK-Phosphorylierung führt. Ein MEK-Inhibitor verringert dagegen die Renin- und Prorenin-induzierte ERK-Aktivierung.

Aliskiren und HRP haben keinen Einfluß auf die Renin- und Prorenin-induzierten ERK-Phosphorylierungen in U937-Zellen und CASMC. Demzufolge ist Aliskiren kein (P)RR-Blocker. Für HRP kann in Durchflußzytometerversuchen gezeigt werden, dass dieses Peptid an U937-Zellen konzentrationsabhängig und kompetitiv bindet. Die Bindung von HRP erfolgt aber auch an ES-Zellen, die die Transmembrandomäne des (P)RR nicht exprimieren. In den hier gezeigten in vitro Ergebnissen verhält sich HRP nicht wie ein spezifischer (P)RR-

Blocker. Die Wirkung von HRP in den verschiedensten Tiermodellen scheint also durch einen anderen Mechanismus bedingt zu sein. Die in vivo Ergebnisse des Vergleichs der Wirkungen von HRP und Aliskiren in dTGR zeigen, dass Aliskiren die Mortalität und den Blutdruck senkt und zu einer starken Verbesserung des Nierenschadens führt. HRP-Behandlung dagegen hat keinen Einfluß auf Sterblichkeit, Blutdruck und überraschenderweise auch nicht auf den Nierenschaden dieser Tiere. dTGR haben hohe Renin- und Proreninspiegel. Es bleibt zu untersuchen, ob HRP vielleicht nur in Modellen wirken kann, die ausschließlich hohe Proreninspiegel aufweisen, wie zum Beispiel bei Diabetes.

Bei der Untersuchung der (P)RR-mRNA-Expression für verschiedene Organe in Tiermodellen mit unterschiedlich aktiviertem RAS fällt auf, dass der (P)RR in Abhängigkeit von der (Pro)reninkonzentration und vom Organsystem unterschiedlich reguliert wird. Regulationen des (P)RR sind im TGR(hRen)-Modell im Vergleich zu SD-Ratten in der 7. Lebenswoche nachweisbar. Im Herzen dieser TGR(hRen) kann eine Hochregulation des (P)RR nachgewiesen werden. Diese geht einher mit einer erhöhten Genexpression von Ratten-TGFbeta1 und mit einer verstärkten Ablagerung von Kollagen I. In der Rattenniere von TGR(hRen) und auch in Glomeruli von dTGR kann eine Herunterregulation des (P)RR im Vergleich zu SD-Ratten gezeigt werden. Diese geht aber nicht mit einer gleichzeitigen Hochregulation des Gens der PI3K-p85 α -Untereinheit einher. In der Rattenleber ist die (P)RR-Expression in den drei untersuchten Modellen gleich hoch. Aus diesen Ergebnissen kann man ableiten, dass der Mechanismus einer Herunterregulation von (P)RR unter Hochreninbedingungen nur in vitro in bestimmten Zelltypen, aber nicht allgemeingültig zu sein scheint.

Eine weitere auffällige Eigenschaft der TGR(hRen) ist ihr erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu SD-Ratten. Die gesteigerte Nahrungsaufnahme der Tiere und die erhöhte Leptin-mRNA-Expression deuten auf eine Störung des Appetitverhaltens hin. Ob der (P)RR im Gehirn in diesem Prozeß eine Rolle spielt, muß weiter untersucht werden und bleibt interessant für die Suche nach RAS-unabhängigen Funktionen von (P)RR.

11 Abstract

The recently described (P)RR is a new transmembrane receptor that binds both renin and prorenin. This binding increases the catalytic activity of renin four to five fold, activates prorenin nonproteolytically and induces the activation of MAP-kinase ERK1/2.

The (P)RR signalling induced by renin or prorenin has been investigated in this PhD thesis. This study provides the first evidence that prorenin can induce ERK 1/2 signaling independent of angiotensin II. The (P)RR is expressed in U937-cells and in CASMC. Cell stimulation with renin or prorenin do not influence gene expression of (P)RR. Renin or prorenin-induced ERK 1/2 phosphorylation is independent of angiotensin II. Several issues support this conclusion. First, preincubation of the cells with an AT1-blocker and an AT2-blocker before stimulating cells with renin or prorenin excludes angiotensin II induced signalling. Second, renin or prorenin-induced ERK 1/2 phosphorylation has also been shown in AT1A-ko-cells. Third, the EGF-receptor is not involved in renin and prorenin-induced ERK 1/2 phosphorylation in U937-cells. Altogether, these findings speak against an involvement of angiotensin II in (pro)renin induced signalling, because transactivation of EGF-receptor is necessary for angiotensin II induced ERK 1/2 phosphorylation. PKC α/β is not involved in renin and prorenin-induced ERK-phosphorylation in U937-cells. Nevertheless an involvement of PKC cannot be excluded completely in long lasting ERK 1/2 phosphorylation as in U937-cells. The involvement of M6P-receptor in renin and prorenin-induced ERK 1/2 phosphorylation can be excluded since deglycosylated renin that can not bind to M6P-receptor, but still induces ERK 1/2 phosphorylation. A MEK inhibitor decreases renin and prorenin-induced ERK 1/2 phosphorylation.

Aliskiren and HRP do not influence renin or prorenin-induced ERK 1/2 phosphorylation in U937-cells and in CASMC. Therefore, Aliskiren is not (P)RR blocker. Fluorescence-activated cell sorter analysis in U937-cells shows that HRP can bind in a dose-dependent and competitive manner. However, HRP can also bind to embryonic stem cells with a gene trap for the (P)RR. The presented in vitro results don't support the notion that HRP acts as a specific (P)RR-blocker. The effects of HRP in many animal models seem to be mediated by an alternative mechanism. In vivo results of the comparison of the effects of Aliskiren and HRP in dTGR show that Aliskiren decreases mortality and blood pressure and causes an amazing improvement of kidney damage. Treatment with HRP has no effect on mortality, blood pressure and surprisingly on kidney damage of dTGR. dTGR have high renin and

prorenin levels. It remains to be investigated whether HRP can only work in models with exclusively high prorenin levels such as in diabetes.

The investigation of (P)RR mRNA regulation in different organs of different animal models shows that the regulation is dependent on (pro)renin concentration and on the investigated organ system. For example, high human renin in TGR(hRen) shows a higher cardiac (P)RR expression compared to non-transgenics, which is accompanied by an upregulation of rat TGFbeta1 and collagen I. A downregulation of (P)RR in comparison to SD rats was observed in rat kidneys of TGR(hRen) as well as in glomeruli of dTGR. These findings were not accompanied by an upregulation of the PI3K p85 α gene. The (P)RR expression is not changed between the investigated groups in the liver. Therefore, the presented thesis could not demonstrate a common mechanism of (P)RR regulation under in vivo situation. A further striking feature of the TGR(hRen) is their increased body weight in comparison to SD rats. The increased food intake and the increased leptin mRNA expression indicate a disturbance in appetite behavior. Whether (P)RR in the brain is involved in this process has to be elucidated in future.

12 Literaturverzeichnis

1. Tigerstedt R, B.P., *Niere und Kreislauf*. Skand Arch Physiol., 1898. **8**: p. 223-271.
2. Danser, A.H., et al., *Determinants of interindividual variation of renin and prorenin concentrations: evidence for a sexual dimorphism of (pro)renin levels in humans*. J Hypertens, 1998. **16**(6): p. 853-62.
3. Reudelhuber, T.L., et al., *Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues*. Kidney Int, 1994. **46**(6): p. 1522-4.
4. Neves, F.A., K.G. Duncan, and J.D. Baxter, *Cathepsin B is a prorenin processing enzyme*. Hypertension, 1996. **27**(3 Pt 2): p. 514-7.
5. Toffelmire, E.B., et al., *Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay*. J Clin Invest, 1989. **83**(2): p. 679-87.
6. Derkx, F.H., et al., *Nonproteolytic "activation" of prorenin by active site-directed renin inhibitors as demonstrated by renin-specific monoclonal antibody*. J Biol Chem, 1992. **267**(32): p. 22837-42.
7. Pitarresi, T.M., et al., *Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 11753-9.
8. Suzuki, F., et al., *Human prorenin has "gate and handle" regions for its non-proteolytic activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22217-22.
9. Deinum, J., F.H. Derkx, and M.A. Schalekamp, *Probing epitopes on human prorenin during its proteolytic and non-proteolytic activation*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1388**(2): p. 386-96.
10. Deinum, J., F.H. Derkx, and M.A. Schalekamp, *Improved immunoradiometric assay for plasma renin*. Clin Chem, 1999. **45**(6 Pt 1): p. 847-54.
11. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 415-72.
12. Gomez, R.A., et al., *Renin and angiotensinogen gene expression in maturing rat kidney*. Am J Physiol, 1988. **254**(4 Pt 2): p. F582-7.
13. Ingelfinger, J.R., et al., *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): p. 417-23.
14. Yanagawa, N., et al., *Production of angiotensinogen and renin-like activity by rabbit proximal tubular cells in culture*. Kidney Int, 1991. **39**(5): p. 938-41.
15. Bruneval, P., et al., *Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization*. Histochemistry, 1986. **85**(1): p. 73-80.
16. Nishiyama, A., D.M. Seth, and L.G. Navar, *Renal interstitial fluid concentrations of angiotensins I and II in anesthetized rats*. Hypertension, 2002. **39**(1): p. 129-34.
17. Danser, A.H., *Local renin-angiotensin systems*. Mol Cell Biochem, 1996. **157**(1-2): p. 211-6.
18. Muller, D.N., et al., *Local angiotensin II generation in the rat heart: role of renin uptake*. Circ Res, 1998. **82**(1): p. 13-20.
19. Saris, J.J., et al., *Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II*. Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 573-7.
20. Saris, J.J., et al., *High-affinity prorenin binding to cardiac man-6-P/IGF-II receptors precedes proteolytic activation to renin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(4): p. H1706-15.
21. van den Eijnden, M.M., et al., *Prorenin accumulation and activation in human endothelial cells: importance of mannose 6-phosphate receptors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(6): p. 911-6.

22. Sealey, J.E., et al., *Specific prorenin/renin binding (ProBP). Identification and characterization of a novel membrane site.* Am J Hypertens, 1996. **9**(5): p. 491-502.
23. Nguyen, G., et al., *Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen.* Kidney Int, 1996. **50**(6): p. 1897-903.
24. Nguyen, G., et al., *Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin.* J Clin Invest, 2002. **109**(11): p. 1417-27.
25. Ramser, J., et al., *A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(8): p. 1019-27.
26. Burckle, C. and M. Bader, *Prorenin and its ancient receptor.* Hypertension, 2006. **48**(4): p. 549-51.
27. Ludwig, J., et al., *Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules.* J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 10939-47.
28. Amsterdam, A. and T.S. Becker, *Transgenes as screening tools to probe and manipulate the zebrafish genome.* Dev Dyn, 2005. **234**(2): p. 255-68.
29. Amsterdam, A., et al., *Identification of 315 genes essential for early zebrafish development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 12792-7.
30. Huang, Y., et al., *Renin-stimulated TGF-beta1 expression is regulated by a mitogen-activated protein kinase in mesangial cells.* Kidney Int, 2007.
31. Huang, Y., et al., *Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms.* Kidney Int, 2006. **69**(1): p. 105-13.
32. Schefe, J.H., et al., *A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein.* Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1355-66.
33. Ichihara, A., et al., *Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(7): p. 1950-61.
34. Ichihara, A., et al., *Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin.* J Clin Invest, 2004. **114**(8): p. 1128-35.
35. Ichihara, A., et al., *Contribution of nonproteolytically activated prorenin in glomeruli to hypertensive renal damage.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2495-503.
36. Ichihara, A., et al., *Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension.* Hypertension, 2006. **47**(5): p. 894-900.
37. Kaneshiro, Y., et al., *Slowly Progressive, Angiotensin II-Independent Glomerulosclerosis in Human (Pro)renin Receptor-Transgenic Rats.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(6): p. 1789-95.
38. Kaneshiro, Y., et al., *Increased expression of cyclooxygenase-2 in the renal cortex of human prorenin receptor gene-transgenic rats.* Kidney Int, 2006. **70**(4): p. 641-6.
39. Luetscher, J.A., et al., *Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications.* N Engl J Med, 1985. **312**(22): p. 1412-7.
40. Stanton, A., et al., *Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren.* Hypertension, 2003. **42**(6): p. 1137-43.
41. Oparil, S., et al., *Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: a randomised, double-blind trial.* Lancet, 2007. **370**(9583): p. 221-9.
42. Muller, D.N. and F.C. Luft, *Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage.* Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(2): p. 221-8.

43. Shagdarsuren, E., et al., *Complement activation in angiotensin II-induced organ damage*. *Circ Res*, 2005. **97**(7): p. 716-24.
44. Ganten, D., et al., *Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(16): p. 7806-10.
45. Wagner, J., F. Thiele, and D. Ganten, *The renin-angiotensin system in transgenic rats*. *Pediatr Nephrol*, 1996. **10**(1): p. 108-12.
46. Bader, M., et al., *Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research*. *J Mol Med*, 2001. **79**(2-3): p. 76-102.
47. Mervaala, E.M., et al., *Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension*. *Hypertension*, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 389-95.
48. Luft, F.C., et al., *Hypertension-induced end-organ damage : A new transgenic approach to an old problem*. *Hypertension*, 1999. **33**(1 Pt 2): p. 212-8.
49. Muller, D.N., et al., *Angiotensin-induced inflammation and vascular injury*. *Contrib Nephrol*, 2001(135): p. 138-52.
50. Pilz, B., et al., *Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats*. *Hypertension*, 2005. **46**(3): p. 569-76.
51. Saris, J.J., et al., *Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II*. *Hypertension*, 2006. **48**(4): p. 564-71.
52. van Kesteren, C.A., et al., *Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells*. *Hypertension*, 1997. **30**(6): p. 1389-96.
53. Marshall, C.J., *Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 179-85.
54. Satoh, T., M. Nakafuku, and Y. Kaziro, *Function of Ras as a molecular switch in signal transduction*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(34): p. 24149-52.
55. Santos, S.D., P.J. Verveer, and P.I. Bastiaens, *Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(3): p. 324-30.
56. Kholodenko, B.N., *Untangling the signalling wires*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(3): p. 247-9.
57. Eguchi, S. and T. Inagami, *Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase*. *Regul Pept*, 2000. **91**(1-3): p. 13-20.
58. Eguchi, S., et al., *Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(52): p. 36843-51.
59. Carey, R.M. and H.M. Siragy, *Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation*. *Endocr Rev*, 2003. **24**(3): p. 261-71.
60. Horiuchi, M., M. Akishita, and V.J. Dzau, *Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system*. *Hypertension*, 1999. **33**(2): p. 613-21.
61. Azizi, M. and J. Menard, *Combined blockade of the renin-angiotensin system with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists*. *Circulation*, 2004. **109**(21): p. 2492-9.
62. Bing, J., *Rapid marked increase in plasma renin in rats treated with inhibitors of the renin system. Effects of 1-sar-8-ala-angiotensin II and of a synthetic converting enzyme inhibitor (nonapeptide, SQ 20.881) on normal and adrenalectomized rats*. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]*, 1973. **81**(3): p. 376-8.
63. Vander, A.J. and G.W. Geelhoed, *Inhibition of renin secretion by angiotensin. II*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1965. **120**(2): p. 399-403.

64. Hollenberg, N.K., N.D. Fisher, and D.A. Price, *Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system*. *Hypertension*, 1998. **32**(3): p. 387-92.
65. Borghi, C., et al., *Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors*. *J Clin Pharmacol*, 1993. **33**(1): p. 40-5.
66. Roig, E., et al., *Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure*. *Eur Heart J*, 2000. **21**(1): p. 53-7.
67. Siragy, H.M., et al., *Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation*. *Hypertension*, 2005. **45**(1): p. 133-7.
68. Zhang, X., et al., *Retinal expression of vascular endothelial growth factor is mediated by angiotensin type 1 and type 2 receptors*. *Hypertension*, 2004. **43**(2): p. 276-81.
69. Nussberger, J., et al., *Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril*. *Hypertension*, 2002. **39**(1): p. E1-8.
70. Gradman, A.H., et al., *Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients*. *Circulation*, 2005. **111**(8): p. 1012-8.
71. Azizi, M., et al., *Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist valsartan on the angiotensin II-renin feedback interruption*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(12): p. 3126-33.
72. Alderman, M.H., et al., *Plasma renin activity: a risk factor for myocardial infarction in hypertensive patients*. *Am J Hypertens*, 1997. **10**(1): p. 1-8.
73. Burckle, C.A., et al., *Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats*. *Hypertension*, 2006. **47**(3): p. 552-6.
74. Schefe, J.H., T. Unger, and H. Funke-Kaiser, *PLZF and the (pro)renin receptor*. *J Mol Med*, 2008. **86**(6): p. 623-7.
75. Feldt, S., et al., *Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide*. *Hypertension*, 2008. **51**(3): p. 682-8.
76. Mercure, C., et al., *Molecular analysis of human prorenin prosegment variants in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(27): p. 16355-9.
77. Nabi, A.H., et al., *Binding properties of rat prorenin and renin to the recombinant rat renin/prorenin receptor prepared by a baculovirus expression system*. *Int J Mol Med*, 2006. **18**(3): p. 483-8.
78. De Mello, W.C. and A.H. Danser, *Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system*. *Hypertension*, 2000. **35**(6): p. 1183-8.
79. Danser, A.H., et al., *Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis*. *Hypertension*, 1994. **24**(1): p. 37-48.
80. Katz, S.A., et al., *Effect of bilateral nephrectomy on active renin, angiotensinogen, and renin glycoforms in plasma and myocardium*. *Hypertension*, 1997. **30**(2 Pt 1): p. 259-66.
81. Mervaala, E., et al., *Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes*. *Hypertension*, 2000. **35**(2): p. 587-94.
82. Muller, D.N., et al., *(Pro)renin receptor peptide inhibitor "handle-region" peptide does not affect hypertensive nephrosclerosis in Goldblatt rats*. *Hypertension*, 2008. **51**(3): p. 676-81.

83. Wilson, D.M. and J.A. Luetscher, *Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1990. **323**(16): p. 1101-6.
84. Mai, M., et al., *Early interstitial changes in hypertension-induced renal injury*. Hypertension, 1993. **22**(5): p. 754-65.
85. Hilgers, K.F., et al., *Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents lethal malignant hypertension: relation to kidney inflammation*. Circulation, 2001. **104**(12): p. 1436-40.
86. Krebs, C., et al., *Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats*. Kidney Int, 2007. **72**(6): p. 725-30.
87. Susic, D., et al., *Cardiovascular effects of nonproteolytic activation of prorenin*. Hypertension, 2006. **48**(6): p. e113; author reply e114.
88. Batenburg, W.W., et al., *Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor*. J Hypertens, 2007. **25**(12): p. 2441-53.
89. Mukhopadhyay, A.K., et al., *Human seminal fluid contains significant quantities of prorenin: its correlation with the sperm density*. Mol Cell Endocrinol, 1995. **109**(2): p. 219-24.
90. Itskovitz, J., et al., *Plasma prorenin response to human chorionic gonadotropin in ovarian-hyperstimulated women: correlation with the number of ovarian follicles and steroid hormone concentrations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(20): p. 7285-9.
91. Berka, J.L., et al., *Renin-containing Muller cells of the retina display endocrine features*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(7): p. 1450-8.
92. Peters, J. and S. Clausmeyer, *Intracellular sorting of renin: cell type specific differences and their consequences*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(12): p. 1561-8.

13 Publikationsverzeichnis

Feldt S, Maschke U, Dechend R, Luft FC, Muller DN.

The putative (pro)renin receptor blocker HRP fails to prevent (pro)renin signaling.

J Am Soc Nephrol. 2008 Apr;19(4):743-8.

Feldt S, Batenburg WW, Mazak I, Maschke U, Wellner M, Kvakana H, Dechend R, Fiebeler A, Burckle C, Contrepas A, Jan Danser AH, Bader M, Nguyen G, Luft FC, Muller DN.

Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide.

Hypertension. 2008 Mar;51(3):682-8.

Muller DN, Klanke B, **Feldt S**, Cordasic N, Hartner A, Schmieder RE, Luft FC, Hilgers KF.

(Pro)renin receptor peptide inhibitor „handle-region“ peptide does not affect hypertensive nephrosclerosis in Goldblatt rats.

Hypertension. 2008 Mar;51(3):676-81.

Fischer R, Dechend R, Qadri F, Markovic M, **Feldt S**, Herse F, Park JK, Gapelyuk A, Schwarz I, Zacharzowsky UB, Plehm R, Safak E, Heuser A, Schirdewan A, Luft FC, Schunck WH, Muller DN.

Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and direct renin inhibition improve electrical remodeling in a model of high human renin hypertension.

Hypertension 2008 Feb;51(2):540-6.

Park JK, Fischer R, Dechend R, Shagdarsuren E, Gapeljuk A, Wellner M, Meiners S, Gratze P, Al-Saadi N, **Feldt S**, Fiebeler A, Madwed JB, Schirdewan A, Haller H, Luft FC, Muller DN.

p38 mitogen-activated protein kinase inhibition ameliorates angiotensin II-induced target organ damage.

Hypertension. 2007 Mar;49(3):481-9.

Feldmann DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, Mueller DN, **Feldt S**, Cumin F, Maniara W, Persohn E, Schuetz H, Jan Danser AH, Nguyen G.

Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats.

Hypertension. 2008 Jul;52(1):130-6.

Gratze P, Dechend R, Stocker C, Park JK, **Feldt S**, Shagdarsuren E, Wellner M, Gueler F, Rong S, Gross V, Obst M, Plehm R, Alenina N, Zenclussen A, Titze J, Small K, Yokota Y, Zenke M, Luft FC, Muller DN.

Novel role for inhibitor of differentiation 2 in the genesis of angiotensin II-induced hypertension.

Circulation. 2008 May 20;117(20):2645-56.

14 Vorträge

Council for High Blood Pressure Research in Tucson (28.09.2007)

Effect of Aliskiren and Handle Region Peptide (HRP) in vitro and in vivo

31. Wissenschaftlicher Kongress - Hypertonie 2007 in Bochum (24.11.2007)

Aliskiren, aber nicht ein (P)RR-Blocker, verbessert Angiotensin II induzierten Nierenschaden

Hypertension Berlin 2008 (18.06.2008)

Role of the (pro)renin receptor in a transgenic model of high human renin hypertension

15 Posterpräsentationen

31. Wissenschaftlicher Kongress Hypertonie 2007 (24.11.2007)

Prorenin- oder Renin-induzierte ERK1/2 Aktivierung in Monozyten wird nicht durch Aliskiren oder das Handle Region Peptid gehemmt

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – 74. Jahrestagung Mannheim (28.03.2008)

Die Rolle des (Pro)reninrezeptors in transgenen Ratten mit Renin-abhängigem Blutdruck

16 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.