

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin

Raphaela Farrenkopf

aus Karlsruhe

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2000

Thema

Die Herkunft von Renin im Rattenherz: de novo-Synthese oder Aufnahme?

Gutachter: Priv. Doz. Dr. Jörg Peters

Prof. Dr. Eberhard Hackenthal

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis:

1 Einleitung	8
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	8
1.2 Das Renin-Angiotensin-System	9
1.3 Lokale Renin-Angiotensin-Systeme	10
1.4 Existiert ein lokales Renin-Angiotensin-System im Herz?	11
1.5 Wird Renin im Herz de novo synthetisiert?	12
1.6 Stammt kardiales Renin aus einer Aufnahme aus der Zirkulation?	13
1.7 Ren2-transgene Ratten als Modell für kardiovaskuläre Erkrankungen	13
2 Fragestellung	16
3 Methoden	17
3.1 Methoden zur Arbeit mit DNA	17
3.1.1 Steriles Arbeiten	17
3.1.2 Anzucht von E.coli	17
3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA	18
3.1.4 Restriktion von DNA	18
3.1.5 Gelelektrophorese von DNA	19
3.1.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Gelen	20
3.1.7 Zusätzliche enzymatische Veränderungen der DNA	20
3.1.8 Klonierung in E.coli	21
3.1.9 Sequenzierung von DNA	23
3.1.9.1 Sequenzreaktion	23
3.1.9.2 Sequenzgele	24
3.2 In vitro Transkriptionen	25
3.3 In vitro Translation	25
3.4 Importexperimente	26
3.4.1 Kardiomyozytenisolation	26

3.4.2 Percollgradient	28
3.4.3 Import	29
3.4.4 MTT-Test	30
3.5 Proteingele	31
3.5.1 Gelelektrophorese von Proteinen	31
3.5.2 Anfärbung und Fluorographie von Proteingelen	32
3.6 RT-PCR	34
3.6.1 RNA-Isolation	34
3.6.2 Qualitative und quantitative Bestimmungen	35
3.6.3 cDNA-Synthese	36
3.6.4 PCR	37
3.7 Zellkultur	38
3.7.1 Zellkultur mit HepG2-Zellen	38
3.7.2 Transfektion in HepG2-Zellen	39
4 Material	40
4.1 Chemikalien	40
4.2 DNA-Längenstandards	40
4.3 Molekulargewichtsmarker für Proteine	40
4.4 Vektoren und Wirtsstämme	41
4.5 Versuchstiere	41
4.6 Primer für die PCR	41
4.6.1 mRNA-Nachweis	41
4.6.2 cDNA-Klone	43
4.6.3 Sonstige Verwendungszwecke	44
5 Resultate	46
5.1 Reninexpression im Herz	48
5.1.1 Primerwahl	49
5.1.2 Semiquantitative RT-PCR	56

5.1.2.1 Verkürztes Renin als interner Standard	58
5.1.2.2 GAP-DH als interner Standard	61
5.2 Aufnahmeexperimente in isolierte Kardiomyozyten	63
5.2.1 Isolation von Ren2-mRNA aus der Mausspeicheldrüse und Klonierung verschiedener Reninkonstrukte	63
5.2.2 In vitro Transkription und in vitro Translation	67
5.2.3 Kardiomyozytenisolation	67
5.2.4 Percollgradient	68
5.2.5 Aufnahmeexperimente	72
5.2.5.1 Importexperimente mit verschiedenen Reninkonstrukten aus Ratte und Maus	72
5.2.5.2 Importexperimente über Nacht	75
5.2.5.3 Importexperimente mit Protein D36	77
5.2.5.4 Importexperimente mit den Peptiden 789 und 790	77
5.2.5.5 Importexperimente mit unmarkiertem aktivem Renin der Ratte (R2)	79
5.2.5.6 Importexperimente mit Mannose-6-phosphat	81
5.2.5.7 Importexperimente mit Concanavalin A und Ammoniumchlorid	83
5.3 Herstellung rekombinanter Renine in Zellkultur	85
5.3.1 Konstruktion der einzelnen Reninplasmide für die Transfektion	85
5.3.2 Transfektion	88
6 Diskussion	90
6.1 Risikofaktor Herzhypertrophie	90
6.2 Lokales RAS im Herz	92
6.3 Definition eines lokalen Systems	93
6.4 Intrakardiales Renin in SD- und Ren2-transgenen Ratten	96
6.5 Aufnahme von Renin ins Herz	99
6.6 Rekombinantes Renin aus der Zellkultur	103
6.7 Existiert ein lokales Renin-Angiotensin-System im Herz?	104
7 Zusammenfassung	105
8 Abkürzungen	106

8.1 Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Enzyme	106
8.2 Basen, Nukleotide und Nukleinsäuren	108
8.3 Aminosäuren	109
8.4 Proteine und Proteinkomplexe	110
9 Literaturverzeichnis	111
10 Danksagungen	119
11 Lebenslauf	120

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in unserer Zivilisation nach wie vor die häufigste Todesursache. Erkrankungen wie Herzinfarkt und Herz- oder Niereninsuffizienz sind häufig schwerwiegend und deshalb auf lange Sicht lebensbedrohend. Ein Herzinfarkt kann beispielsweise zu Veränderungen im Herzgewebe führen, die ihrerseits die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auslösen können. Die pathomorphologischen Veränderungen, die dabei auftreten, werden als ventrikuläres „Remodeling“ bezeichnet. Dabei kommt es zu einer Verschiebung der linksventrikulären Geometrie und zu strukturellen Veränderungen, die ihrerseits eine Kaskade an systemischen Reaktionen hervorrufen. So entsteht eine Kammerdilatation, die ursprünglich über ein erhöhtes Füllungsvolumen wieder eine normale Herzfunktion ermöglichen sollte, jedoch bei einem ausgedehnten Infarkt-bereich zu einer Herzinsuffizienz führen kann.

Ein wichtiger Vorgang beim ventrikulären „Remodeling“ ist die Hypertrophie der Herzmuskelzellen, bei der sich die Zellen sowohl in der Länge als auch im Durchmesser vergrößern. Wodurch eine Hypertrophie ausgelöst werden kann, wurde in den letzten Jahren verstärkt am Beispiel der linksventrikulären Hypertrophie untersucht, die häufig bei einer Hypertonie als kompensatorische Antwort auf die erhöhte Nachlast auftritt. In klinischen Studien wurde bald erkannt, daß das Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie nicht unbedingt mit dem Grad der Hypertonie korreliert. Das bedeutet, daß es außer den Dehnungsreizen, die aus der erhöhten Druck- bzw. Volumenbelastung resultieren, zusätzliche Faktoren geben muß, die die Entwicklung einer Hypertrophie beeinflussen. So scheint u.a. das Renin-Angiotensin-System in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen, da Ang II in der Lage ist, in Zellkultur eine Hypertrophie von Kardiomyozyten hervorzurufen (Review: Yamazaki *et al.*, 1996).

1.2 Das Renin-Angiotensin-System

Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und dem RAS ist seit langem bekannt. Allele der RAS-Gene wurden entdeckt, die man mit Blutdruckveränderungen und unterschiedlichen Erkrankungen in Verbindung bringen konnte. So trat beispielsweise eine Schwangerschaftshypertonie zusammen mit einem bestimmten Angiotensinogen-Allel auf, Herzinfarkt und linksventrikuläre Hypertrophie dagegen mit einem Doppeldeletionsallel des ACE-Gens (Review: Peters, 1995). Die zentrale Rolle des RAS in der Blutdruckregulation, sowie im Elektrolyt- und Wasserhaushalt, macht die teilweise schwerwiegenden Auswirkungen verständlich, die Veränderungen in der Konzentration oder Aktivität der einzelnen RAS-Komponenten im Organismus zur Folge haben.

Der klassischen Definition zufolge beeinflusst das RAS den Blutdruck über sein Effektorpeptid Angiotensin II (Ang II), das im Blutkreislauf über eine Enzymkaskade gebildet wird. Das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist die Aspartylprotease Renin, die in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet und aus diesen reguliert sezerniert wird. Renin spaltet hochspezifisch ein einziges Substrat, das aus der Leber stammende Angiotensinogen, wobei das Decapeptid Angiotensin I (Ang I) entsteht. Ang I wiederum wird durch endothelgebundenes Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) um zwei weitere Aminosäuren zum Oktapeptid Ang II verkürzt, das seinerseits zu verschiedenen aktiven oder inaktiven Fragmenten metabolisiert wird. Ang II reguliert zentral den Blutdruck, stimuliert die Synthese und Sekretion von Aldosteron aus der Nebenniere, erhöht die Salz- und Wasserretention in Niere und Dünndarm, führt zu einer Vasokonstriktion in den Gefäßen, steigert die Kontraktilität im Herz, moduliert den Sympathikustonus sowohl peripher als auch zentral, bewirkt eine erhöhte Katecholaminfreisetzung und fördert die Entwicklung von Hypertrophie in Muskelzellen (Review: Yamazaki *et al.*, 1996).

Ang II wirkt über spezifische Angiotensin II-Rezeptoren (AT-Rezeptoren), die sich auf der Zellmembran der Zielzellen befinden. Man kennt zwei verschiedene Rezeptoren, nämlich den AT₁- und den AT₂-Rezeptor. Beim AT₁-Rezeptor der Ratte treten zwei Subtypen auf, der AT_{1A}- und der AT_{1B}-Rezeptor, die in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Verhältnissen exprimiert werden. So überwiegt der AT_{1A}-Rezeptor beispielsweise im kardiovaskulären Gewebe, während der AT_{1B}-Rezeptor in Drüsengewebe wie

Nebenniere oder Hypophyse den größeren Anteil ausmacht (Review: Inagami 1999). Die meisten bekannten Ang II-Wirkungen werden durch den AT₁-Rezeptor vermittelt. Dabei handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der Signale intrazellulär über die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat und Diacylglycerol weiterleitet. In der Zelle kommt es abhängig vom Zelltyp zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration oder zu einer Interaktion mit dem Adenylatzyklase-System. Die Bedeutung des AT₂-Rezeptors hingegen ist noch nicht geklärt, sowohl der Mechanismus der AT₂-vermittelten Wirkung als auch der Signalweg in der Zelle bedürfen noch näherer Untersuchungen (Review: Inagami, 1999). Der Rezeptor wird in erster Linie während der embryonalen und fetalen Entwicklungsstufe exprimiert, in der adulten Ratte findet man eine Expression unter anderem in Nebenniere, Herz, Aorta, Niere und verschiedenen Regionen des Gehirns. Sowohl der AT₁- wie auch der AT₂-Rezeptor scheinen für Zellproliferation und Zelldifferenzierung von Bedeutung zu sein. Während AT₁-Rezeptorvermittelte Signale wahrscheinlich das Zellwachstum steigern, werden dem AT₂-Rezeptor eher die Vermittlung von Signalen zugeschrieben, die ein solches Wachstum unterdrücken und möglicherweise sogar eine Apoptose auslösen könnten (Review: Inagami, 1999).

1.3 Lokale Renin-Angiotensin-Systeme

Das Konzept eines zirkulierenden RAS, das lediglich über die Blutbahn agiert, reicht heute nicht mehr aus, um alle physiologischen und pathophysiologischen Effekte des Systems im Organismus zu erklären. Hinweise auf die Existenz lokaler Systeme häufen sich und inzwischen geht man davon aus, daß es neben dem klassischen systemischen RAS in Geweben lokale Systeme gibt, die lokale Funktionen übernehmen. Ihre physiologische Bedeutung wird allerdings noch immer diskutiert. Lokale Systeme wurden unter anderem für die Niere, die Nebenniere, das Gehirn, das Herz und die Gefäße beschrieben (Review: Bader *et al.*, 1994).

1.4 Existiert ein lokales Renin-Angiotensin-System im Herz?

In den letzten beiden Jahrzehnten haben die Interaktionen zwischen Herz und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in der Kardiologie zunehmend an Bedeutung gewonnen, zumal sich durch die Hypothese eines lokalen Systems im Herz ein vielversprechendes neues Forschungsfeld eröffnete. Untersuchungen ergaben, daß die Gabe von ACE-Hemmern eine Herzhypertrophie in Menschen und im Tiermodell verringert, im Tierversuch sogar bei der Verwendung von Dosierungen, die den Blutdruck nicht veränderten und so einen lediglich hämodynamisch bedingten Effekt ausschlossen (Linz *et al.*, 1989). ACE-Hemmer gelten inzwischen als wirkungsvollste Medikamente bei der Therapie der Herzinsuffizienz (Review: Chatterjee, 1996).

Das Herz stellt ein wichtiges Zielorgan für Ang II dar. Man beobachtet eine Zunahme der Kontraktilität und eine Regulation des koronaren Blutflusses, außerdem begünstigt Ang II die Entwicklung einer Herzhypertrophie. Der genaue Mechanismus, der zu diesem Phänomen führt, wird immer noch kontrovers diskutiert, es steht aber inzwischen außer Frage, daß Ang II einen trophischen Einfluß auf Herzmuskelzellen besitzt (Review: Cleland und Reid, 1996).

Auch nach einem Myokardinfarkt scheint den Komponenten des RAS eine entscheidende Rolle bei den nachfolgenden Prozessen zuzukommen. So wurde nach dem Infarkt eine erhöhte Angiotensinogen-Expression beobachtet. In der Postinfarkttherapie konnte durch Gabe von ACE-Hemmern, im Gegensatz zu anderen Vasodilatoren, der „Remodeling“-Prozeß verringert oder sogar verhindert werden. Nach dem Infarkt scheint das lokale RAS aktiviert zu sein, wobei Ang II in dieser ersten Phase durchaus positive Effekte auf Heilung und Zellwachstum zu haben scheint. Auf Dauer allerdings könnte eine erhöhte Ang II-Konzentration die Entwicklung einer ventrikulären Dilatation unterstützen (Review: Bader *et al.*, 1994).

Das Auftreten von RAS-Aktivität im Herz wird aufgrund zahlreicher Befunde inzwischen allgemein akzeptiert. Reicht aber dieser Befund allein aus, um ein lokales System zu postulieren?

1.5 Wird Renin im Herz de novo synthetisiert?

Strenggenommen setzt die Existenz eines lokalen RAS im Herz nicht nur das Vorkommen sondern auch die Bildung aller Systemkomponenten im Herzgewebe voraus, die außerdem zumindest partiell eine gewisse Eigenständigkeit aufweisen und nicht unmittelbar vom zirkulierenden System abhängen sollte. Das Vorkommen von mRNA, die für Angiotensinogen, ACE (Review: Bader *et al.*, 1994) und Ang II-Rezeptoren kodiert (Wolf *et al.*, 1996; Review: Regitz-Zagrosek *et al.*, 1998), ist bekannt. Die de novo-Synthese des Schlüsselenzyms Renin dagegen ist immer noch umstritten. Während einige Gruppen das Vorkommen von Renin-mRNA nachweisen konnten (Passier *et al.*, 1996; Dostal *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995; Flesch *et al.*, 1997), fanden andere zumindest unter nicht-stimulierten Bedingungen kein Transkript (Ekker *et al.*, 1989; Zhao, *et al.*, 1993; Iwai und Inagami 1992) oder nur geringe Mengen (Dzau *et al.*, 1987; Samani *et al.*, 1988). Die kontroverse Diskussion über die Frage der kardialen de novo-Synthese von Renin wird nun noch zusätzlich durch die Entdeckung eines neuen Renintranskripts kompliziert. Diesem Renin fehlt das Exon 1 des Rattenrenins, das die Basensequenz für das Präfragment enthält. Exon 1 ist durch Exon 1A ersetzt, eine 80 Nukleotide lange Sequenz aus dem Intron 1. Die mRNA kodiert für ein verkürztes Prorenin, das keinen Zugang zum sekretorischen Weg des bekannten Rattenrenins hat, es verbleibt intrazellulär. Vergleichbare Reninvarianten wurden auch in Menschen und Mäusen nachgewiesen (Lee *et al.*, 1999). Die Existenz verschiedener Renintranskripte konnte in früheren Untersuchungen nicht berücksichtigt werden. In welcher Weise die beiden Reninvarianten der Ratte zum intrakardialen RAS beitragen wird zur Zeit von unserer Gruppe untersucht (Clausmeyer *et al.*, 2000).

1.6 Stammt kardiales Renin aus einer Aufnahme aus der Zirkulation?

Eine andere Erklärung für die nachgewiesene Existenz von Renin im Herz ist eine Aufnahme aus der Zirkulation. Für diese These spricht die beobachtete Abnahme der Reninkonzentration im Herz nach bilateraler Nephrektomie (Danser *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1997), die auf einen renalen Ursprung des kardialen Renins schließen läßt. Für die Internalisierung selbst werden verschiedene Mechanismen diskutiert, bei denen u.a. die Glykosylierung von Renin eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

Zum einen wurde eine Mannose-6-phosphat-abhängige Aufnahme sowohl von Renin als auch von seiner inaktiven Vorstufe Prorenin beschrieben, wobei Prorenin nach der Aufnahme aktiviert wurde (van Kesteren *et al.*, 1994). Zum anderen fand man spezifische reninbindende Proteine sowie Reninrezeptoren (Campbell und Valentijn, 1994; Sealey *et al.*, 1996), die aber noch nicht näher charakterisiert sind. Ob diese Proteine an der Zelloberfläche verbleiben oder in die Zelle aufgenommen werden, ist noch unklar. Abgesehen von diesen beiden Möglichkeiten scheint auch eine Mannose-6-phosphat-unabhängige Internalisierung von Prorenin über einen unbekanntenen Mechanismus zu existieren, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde.

1.7 Ren2-transgene Ratten als Modell für kardiovaskuläre Erkrankungen

Eine der zentralen Fragestellungen in der Kardiologie ist zur Zeit die Charakterisierung der Ursachen der Herzhypertrophie. Völlig neue Ansätze bei dieser Suche ermöglicht das transgene Rattenmodell TGR(mREN2)²⁷, in dem Hypertonie und Herzhypertrophie durch ein einziges zusätzliches Gen ausgelöst werden, dessen korrespondierendes Protein zudem genau charakterisiert ist. Die transgenen Ratten exprimieren zusätzlich zum Rattenrenin das Ren2-Gen der DBA/2-Maus und entwickeln bereits im Alter von vier Wochen eine starke Hypertonie, die ihr Maximum nach neun Wochen erreicht (Mullins *et al.*, 1990). Das Transgen wird hauptsächlich in den Nebennieren exprimiert, in geringeren

Mengen außerdem noch in anderen Geweben wie beispielsweise im Thymus, im Gehirn, im Darm oder im Fettgewebe (Zhao *et al.*, 1993). In der Niere der transgenen Tiere dagegen ist die Reninexpression wie auch die tatsächliche Reninkonzentration im Vergleich mit nicht transgenen Sprague-Dawley-Tieren (SD) erniedrigt (Hackenthal *et al.*, 1992; Bachmann *et al.*, 1992). Der Blutdruck korreliert nicht mit den Plasmapreninspiegeln, sondern mit den Werten für Plasmaprenin, die mehr als vierzigfach höher als in SD-Tieren sind (Peters *et al.*, 1996).

Die erwachsenen Ren2-transgenen Ratten weisen morphologische Veränderungen in Niere und kardiovaskulärem System auf (Bachmann *et al.*, 1992), die Ähnlichkeit mit den Folgeerscheinungen der Hypertonie beim Menschen haben. Morphologische Untersuchungen zeigen Schäden in den Glomeruli, die im Lauf der Zeit in Glomerulärsklerose übergehen, was vor allem bei homozygoten Tiere häufig zum frühzeitigen Tod führt. Im kardiovaskulären Bereich tritt, bevorzugt in der linken Herzkammer, Herzhypertrophie auf, sowie Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen, in Kombination mit einer Zunahme der extrazellulären Matrix, die das Gefäßlumen zusätzlich verengt (Lee *et al.*, 1991). Daß die auftretende Herzhypertrophie in diesem Fall nicht allein auf den erhöhten Blutdruck zurückzuführen ist, zeigt u.a. ein Experiment von Böhm *et al.*, die eine Verminderung der Hypertrophie durch RAS-Inhibitoren erreichten, ohne den Blutdruck zu senken (Böhm *et al.*, 1995).

Ob eine Herzhypertrophie aber tatsächlich zumindest teilweise auf ein aktiviertes intrakardiales RAS zurückgeführt werden kann, wurde bisher nicht nachgewiesen. Die Bedeutung eines erhöhten zirkulierenden Prorenins für pathologische Entwicklungen im Herzen wurde von J. Peters näher untersucht, indem der intrakardiale Reningehalt im linken Ventrikel von Ren2-transgenen Ratten und von Kontrolltieren mit den jeweiligen Plasmapreninspiegeln verglichen wurde. Dabei konnten in den linken Ventrikeln der transgenen Tiere erhöhte Reninkonzentrationen nachgewiesen werden, die eher mit Plasmaprenin als mit aktivem Renin im Plasma korrelieren. Zusätzliche Informationen lieferte eine intrazelluläre Lokalisation der Reninaktivität in beiden Stämmen. In den SD-Ratten war aktives Renin wie Prorenin vor allem im lysosomalen Kompartiment lokalisiert. In den transgenen Tieren konnte Prorenin nicht mehr eindeutig den intrazellulären Fraktionen zugeordnet werden, die größte Menge fand sich in der zytosolischen bzw. interstitiellen Fraktion. Aktives Renin konnte wie in den Kontrolltieren in der lysosomalen Fraktion nachgewiesen werden, daneben aber auch in Vesikeln etwas größerer Dichte, zu denen

auch schon kleinere Mitochondrien zählen (vergl. Abb.1 und Abb. 2). Diese Beobachtungen belegen eine erhöhte intrakardiale Reninkonzentration der Ren2-transgenen Tiere, lassen aber die Frage nach ihrer Herkunft offen.

2 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Aufklärung der Herkunft von intrakardialem Renin. Dazu ergaben sich folgende Fragen:

1. Welche Renintranskripte werden im Herz exprimiert?
2. Findet eine Aufnahme von Renin aus der Zirkulation in Kardiomyozyten statt?

Zur Beantwortung der Frage Nr.1 sollte eine differentialdiagnostische RT-PCR zur Unterscheidung der verschiedenen Renintranskripte entwickelt werden.

Zur Beantwortung der Frage Nr.2 sollte eine Methode zur Isolation adulter Kardiomyozyten entwickelt werden, um nachfolgend Aufnahmeversuche mit Reninvarianten der Ratte und Maus durchzuführen. Vervollständigt wurde die Aufgabenstellung durch Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus und die Überexpression verschiedener Reninvarianten in HepG2-Zellen.

3 Methoden

3.1 Methoden zur Arbeit mit DNA

3.1.1 Steriles Arbeiten

Bei der Arbeit mit Bakterien wurden grundsätzlich sterile Lösungen und Geräte verwendet. Lösungen wurden, soweit möglich, autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden über Nitrozellulosefilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm sterilfiltriert.

3.1.2 Anzucht von E.coli

Lösungen:

2YT-Medium: 1,6% (w/v) Trypton
 1,0% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) NaCl

2YT-Platten: 2YT-Medium mit 1,5% (w/v) Agar

Lagermedium für Bakterien: 2YT-Medium/Glycerin (1:1)

Anzucht und Lagerung:

E.coli-Zellen wurden, abhängig vom Verwendungszweck, in 3 bzw. 30 ml 2YT-Medium gezüchtet. Zellen, die Plasmide mit einer Antibiotikaresistenz enthielten, wurden in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums kultiviert. Für die Anzucht wurden die Bakterien unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert, sofern nicht anders angegeben.

Stammkulturen von E.coli-Klonen wurden angelegt, indem 0,5 ml Bakteriensuspension in 2YT-Medium sorgfältig mit 0,5 ml sterilem Glycerin gemischt wurden. Diese Kulturen konnten bei -20 °C gelagert werden.

3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurden Minipräparations- bzw. Maxipräparationskits der Firmen Quiagen, Hilden, und Roche, Mannheim, gemäß den Anweisungen der Hersteller verwendet.

3.1.4 Restriktion von DNA

Die Digestion von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Promega, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach) erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen. Für analytische Zwecke wurden 1-2 µg DNA in einem geeigneten Volumen eine Stunde lang inkubiert, präparative Ansätze wurden entsprechend vergrößert. Wurden Plasmide für in vitro Transkriptionen linearisiert, folgten eine Phenol/Chloroform-Extraktion sowie eine Ethanol-fällung. Dazu wurde der Ansatz mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol und dem 0,1fachen Volumen Natriumacetat 3M (pH 5,5) versetzt und mindestens eine Stunde bei -70 °C gefällt.

3.1.5 Gelelektrophorese von DNA

Lösungen:

TAE-Puffer für die Agarosegelelektrophorese (50 x):

2 M Tris-Base
5,71% (v/v) Eisessig
2 mM EDTA pH 8/8,5

Ethidiumbromidstammlösung:

10 mg/ml Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg)

Auftragslösung: 50% (v/v) Glycerin
 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Agarosegelelektrophorese

Es wurden Agarosegele in der Konzentration von 1% Agarose in TAE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Abhängig von der Probenzahl fanden „Minigele“ in einer Größe von 7 x 15,5 cm bzw. 5,5 x 9 cm Verwendung, die bei einer konstanten Spannung von 120 V etwa 30 Min. photographiert wurden. Für präparative Zwecke wurde die Taschengröße durch Abkleben des Kamms variiert, um das Taschenvolumen zu vergrößern. Nach Abschluß der Elektrophorese konnte das Gel auf einem UV-Transilluminator, der die ethidiumbromidgefärbten Nukleinsäuren sichtbar macht, photographiert werden.

3.1.6 Isolation von DNA-Fragmenten aus Gelen

Lösungen und Material:

TE-Puffer (10 x): 0,2M Tris/HCl pH 7,4
 0,05M EDTA

Agarosegelextraktion

Aus Agarosegelen wurden die durch Ethidiumbromidzusatz sichtbar gewordenen DNA-Banden ausgeschnitten und mit dem Agarosegelextraktionskit QIAQuick (Quiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll aus dem Gel isoliert. Dabei war darauf zu achten, die DNA nicht länger als unbedingt nötig der UV-Strahlung auszusetzen, um das Ausmaß an Beschädigungen wie Strangbrüchen so gering wie möglich zu halten.

3.1.7 Zusätzliche enzymatische Veränderungen der DNA

Polynukleotidkinase-Reaktion

Die PNK-Reaktion dient dem Phosphorylieren von unphosphorylierten DNA-Fragmenten, wie sie beispielsweise nach einer PCR entstehen. Erst ein Phosphatüberhang erlaubt die Verknüpfung mit dem nächsten Nukleotid durch eine Ligase. Das Enzym stammte von der Firma New England Biolabs, Schwalbach, und wurde wie vom Hersteller empfohlen verwendet.

Calf-Intestinal-Phosphatase-Reaktion

Beim Klonieren von Fragmenten mit glatten Enden in einen Vektor, der nur mit einem Enzym geschnitten war, ist es von Vorteil, die endständigen Phosphatreste am Vektor durch die Behandlung mit einer CIP (Promega, Mannheim) zu entfernen. Dadurch wird die sonst bevorzugt stattfindende Religation des Vektors verhindert, der Ringschluß erfolgt unter Einbau des erwünschten Inserts. Die Reaktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Auffüllreaktion nach Klenow

Die gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführte Auffüllreaktion mit dem Klenow-Enzym (Promega, Mannheim) komplettiert überhängende restringierte DNA-Enden sowie den Adenosinüberhang am 3'-Ende, der nach der DNA-Synthese mit einer Taq-DNA-Polymerase gebildet wird, zum Doppelstrang, wodurch ein glattes Ende entsteht. In Fällen, in denen keine passenden Restriktionsstellen in Vektor und Insert vorhanden sind, die eine orientierte Insertion über spezifisch geschnittene Enden ermöglichen, erlauben die glatten Enden aus einer Klenow-Reaktion ein unproblematisches Ligieren in den Vektor. Allerdings muß hierbei im Anschluß die korrekte Orientierung überprüft werden.

3.1.8 Klonierung in E.coli

Ligation von DNA

Die verschiedenen Fragmente wurden in einen entsprechend geschnittenen Transkriptionsvektor (Bluescript M13-) entweder mit glatten oder überhängenden Enden ligiert. Dabei wurden die T4 DNA-Ligase und Puffer der Firma Promega (Mannheim) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. In der Regel wurden für einen 20 µl-Ansatz 3-4 µg Fragment und 1 µg Vektor verwendet. Bei der Ligation von zwei Fragmenten über

glatte Enden wurde ein molares Verhältnis der beiden Fragmente zum Vektor von 1:1:0,2 gewählt.

Der Ansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert und dann entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Herstellung kompetenter Zellen

Aus einer Stammkultur eines geeigneten E.coli-Stammes (z.B. JM 109) wurde eine 3 ml-Kultur angeimpft und über Nacht vermehrt. Von dieser Vorkultur wurde ein Aliquot im Verhältnis von 1:100 auf 30 ml 2YT-Medium überimpft und bis zu einer E_{550} von 0,4 bis 0,5 kultiviert. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert (5 Min., 3000 x g, SS34-Rotor, 4 °C), in 15 ml eisgekühlter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für einen Zeitraum von 30-40 Min. auf Eis gestellt. Es folgte eine zweite Zentrifugation (5 Min., 3000 x g), danach wurden die Zellen in 3 ml CaCl_2 -Lösung resuspendiert und entweder sofort für die Transformation verwendet oder bis zu einem Zeitraum von 24 Stunden auf Eis gelagert.

Transformation

Zur Transformation wurde die Hälfte des Ligationsansatzes oder native Plasmid-DNA (20-50 ng) mit 200 μl kompetenten E.coli-Zellen gemischt, 30 Min. auf Eis gehalten und dann 90 Sek. lang auf 42 °C erhitzt. Anschließend wurden die Zellen 2-3 Min. lang auf Eis abgekühlt, mit 800 μl 2YT-Medium versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 Sek.) wurden die Zellen in frischem 2YT-Medium resuspendiert, auf 2YT-Platten mit geeigneten Antibiotika (z.B. Ampicillin, 80-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Selektion

Eine erste Selektion auf erfolgreiche Transformation ist durch die Antibiotika-Resistenz, die im verwendeten Plasmid kodiert ist, gegeben.

Das Vorhandensein des gewünschten Plasmids wird beim hier verwendeten Vektor Bluescript M13⁻ durch eine Farbreaktion angezeigt, die auf der Expression der β -Galaktosidase beruht (Messing *et al.*, 1977). Es wurden 2YT-Platten mit 60 mg/l IPTG und 60 mg/l X-Gal verwendet, um die mit dem Plasmid in die Zellen übertragene β -Galaktosidase zu induzieren, bzw. die Enzymreaktion erkennen zu können. Enthielt das Plasmid kein Fragment, so wurde eine funktionsfähige β -Galaktosidase exprimiert, die das farblose X-Gal in das dunkelblaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo überführte, so daß die betreffenden Kolonien dunkelblau gefärbt waren. Klone, die eine Insertion im Leseraster der β -Galaktosidase enthielten, ergaben dementsprechend farblose Kolonien. In einigen Fällen erwies sich diese Selektion jedoch als unzuverlässig, ein sicheres Ergebnis lieferten erst anschließende Testrestriktionen bzw. Sequenzierungen.

3.1.9 Sequenzierung von DNA

3.1.9.1 Sequenzreaktion

Die hier nach Protokoll des Herstellers durchgeführte enzymatische Sequenzierung von DNA mit dem T7-Sequenzierungskit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) beruht auf der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Methode. An die durch Behandlung mit Hitze oder Lauge einzelsträngig vorliegende DNA, d.h. denaturierte Plasmid-DNA, wird ein kurzes Stück einer komplementären DNA („Primer“) hybridisiert, von dem ausgehend eine DNA-Polymerase in Gegenwart der vier Desoxynukleotide den vollständigen komplementären Strang synthetisieren kann. Eines der Nukleotide ist radioaktiv markiert, und es werden vier parallele Reaktionen durchgeführt, bei denen jeweils eine der Basen in einem bestimmten Konzentrationsverhältnis auch als Didesoxynukleotid zugesetzt wird. Der Einbau dieser Didesoxynukleotide erfolgt statistisch an jeder Base der zu sequenzierenden DNA und hat den Kettenabbruch zur Folge. Es entsteht daher ein Fragmentgemisch, das nach gelelektrophoretischer Auftrennung die Sequenz der DNA wiedergibt.

Es wurden dabei insgesamt 2-3 µg DNA und pro Didesoxynukleotid 0,5 µl ³⁵S-ATP (1000 Ci/mmol) eingesetzt, die benötigten Primer wurden vor der Zugabe zum Reaktionsmix auf 2 µM verdünnt.

3.1.9.2 Sequenzgele

Lösungen:

GTG-Puffer (20x): 216 g/l Tris
 72 g/l Taurin
 4 g/l Na₂EDTA x 2H₂O

Gellösung: 6% Acrylamid-/Harnstoffgel:

 420 g/l Harnstoff
 50 ml/l GTG-Puffer
 150 ml/l Acrylamid 40% (Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, ICN
 Biomedicals, Eschwege)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsreaktionen wurden 0,25 mm dicke Polyacrylamidgele in einer Größe von 56 x 20 x 0,01 cm verwendet. Es wurde jeweils etwa ein Viertel der Ansätze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 1200 V in 1x GTG-Laufpuffer. Die Laufzeit variierte je nach erwünschter Laufstrecke zwischen 2 und 6 Stunden. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele 1-4 Tage mit einem Röntgenfilm exponiert (Ray Max Universal von ICN Biomedicals, Eschwege).

3.2 In vitro Transkriptionen

Die in vitro Transkriptionen der in den Bluescript-Vektor klonierten Gene und Gen-derivate erfolgte unter Verwendung von T3- oder T7-Polymerase, abhängig von der Orientierung der jeweiligen Insertion zum Promotor. Die für die in vitro Transkription verwendeten Plasmide wurden zuvor mit einem geeigneten Restriktionsenzym hinter dem 3'-Ende des inserierten Gens (in Transkriptionsrichtung) linearisiert. In der Regel wurde die in vitro Transkription in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Es wurden Enzyme und entsprechende Puffer der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Die Reaktion wurde nach Protokoll durchgeführt.

Nach Abschluss der Inkubation wurde der Ansatz auf 200 µl verdünnt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA wurde mit Ethanol gefällt und entweder sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst, oder im Fällungsansatz belassen, so daß jeweils nur die benötigte Menge abzentrifugiert wurde. In diesem Fall wurde auf das Waschen mit 70% Ethanol verzichtet und die RNA nach dem Trocknen für die in vitro Translation (vergl. Abschnitt 3.3) verwendet.

3.3 In vitro Translation

Die in vitro Translation erfolgte in Kaninchenretikulozytenlysat (rabbit reticulocyte lysate system von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Grundsätzlich wurden für jede in vitro synthetisierte RNA zunächst Testtranslationen durchgeführt, um die optimale RNA-Konzentration zu bestimmen. Um radioaktiv markiertes Protein für die Aufnahmeexperimente mit Kardiomyozyten zu erhalten, wurden die in vitro Transkripte in Gegenwart von ^{35}S -Methionin (ICN Biomedicals, Eschwege) translatiert. Die Standardansätze für Testtranslationen enthielten 0,5 µl ^{35}S -L-Methionin mit einer spezifischen Aktivität von 1250 Ci/mmol. Wurden die Translationen für Importversuche verwendet, wurde der Ansatz um das 16fache vergrößert und anschließend über Centrex UF-2 mit einer Ausschlußgrenze von 30 kDa (Schleicher und Schuell, Dassel) filtriert, um die hohe K^+ -Ionenkonzentration (130 mM) zu reduzieren und nicht eingebautes ^{35}S -Methionin zu entfernen.

Die Reaktion selbst lief bei 30 °C über einen Zeitraum von 90 Min., danach wurden die Ansätze gelelektrophoretisch über ein Polyacrylamidgel nach Laemmli aufgetrennt (vergl. Abschnitt 3.53.5.1). Bei den Testtranslationen wurde dabei ein halber Translationsansatz aufgetragen.

3.4 Importexperimente

3.4.1 Kardiomyozytenisolation

Lösungen:

Modifizierte Hanksche Grundlösung:

120 mM NaCl
5 mM KCl
1,2 mM KH_2PO_4
35 mM NaHCO_3
20 mM HEPES, pH 7,4
3 mM CaCl_2 (Collagenase-Lsg.)/1,8 mM CaCl_2 (Medium C)
1,2 mM MgSO_4

Collagenase-Lösung: 350 E/l Collagenase (Sigma, Deisenhofen)
100 mg/l DNase (Sigma, Deisenhofen)
2% (w/v) BSA
1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic-Mix
in Modifizierter Hankscher Grundlösung (3 mM CaCl_2)

Medium C: 0,2% (w/v) BSA
1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic-Mix
in Modifizierter Hankscher Grundlösung (1,8 mM CaCl_2)

Inkubationsmedium:	1% (w/v) BSA 1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic-Mix in HAM's F12 (Life Technologies, Karlsruhe)
Waschmedium:	1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic-Mix in HAM's F12
Inhibitormedium:	1 mM PMSF 1% (v/v) Antibiotic/Antimycotic-Mix in HAM's F12
Percollgradient:	30% (v/v) Percoll 121,5 mM NaCl in Waschmedium

Den verwendeten Lösungen wurde ein Antibiotic/Antimycotic-Mix (Life Technologies, Karlsruhe) in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt, um ein Keimwachstum während der Inkubation auszuschließen. Bei der Collagenase handelte es sich um eine Clostridiopeptidase A vom Keim *Clostridium histolyticum* Typ V, der normalerweise für die Isolation von pankreatischen Inselzellen verwendet wird.

Für die Kardiomyozytenisolation wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 300 g verwendet, die nach einer Anästhesie mit Nembutal (60 mg/kg Körpergewicht) durch Genickbruch getötet wurden. Die Herzen wurden entnommen und zum Ausbluten in vorgewärmte Modifizierte Hanksche Grundlösung überführt. Anschließend wurden die Herzen auf Eis mit einem Skalpell zerkleinert. Die Fragmente wurden zunächst 10 Min. bei 37 °C unter Schütteln in 20 ml vorgewärmter Collagenase-Lösung inkubiert und danach 10 mal durch eine 10 ml-Kunststoffpipette auf- und abpipettiert. Über den sedimentierenden Gewebstücken wurde der Überstand abgesaugt und verworfen, da er hauptsächlich Erythrozyten enthielt.

Es folgte eine zweite Inkubation mit 30 ml vorgewärmter Collagenase-Lösung bei 37 °C unter Schütteln, die nach 15 Min. unterbrochen wurde um das Herauslösen der Kardiomyozyten durch 20 maliges Auf- und Abpipettieren zu unterstützen. Die Inkubation wurde weitere 15 Min. fortgesetzt, gefolgt von 20 maligem Auf- und Abpipettieren. Der Überstand über den sedimentierenden Gewebsfragmenten, der die bereits herausgelösten Kardiomyozyten enthielt, wurde abgenommen und durch einen Nylonzellfilter mit einem Porendurchmesser von 70 µm in 20 ml Medium C gefiltert. Die isolierten Kardiomyozyten wurden durch eine Zentrifugation bei 200 x g über 10 Min. bei 15 °C sedimentiert und in 5 ml Medium C aufgenommen.

Die Herzfragmente wurden wieder mit 30 ml vorgewärmter Collagenase-Lösung inkubiert und nach 15 Min. 20 mal auf- und abpipettiert. Der Überstand wurde wie oben beschrieben abgenommen, gefiltert, zentrifugiert und in Medium C aufgenommen, die restlichen Herzfragmente wurden verworfen.

Beide Zellsuspensionen wurden nun vereinigt und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,7 ml Waschmedium aufgenommen und über einen Percollgradienten fraktioniert.

3.4.2 Percollgradient

Das verwendete Percoll (Pharmacia, Freiburg) besaß eine Dichte von 1,125 g/ml und eine Osmolalität von 15 mOs/kg H₂O.

15 g der Percollgradientenmischung wurden mit 2,19 g Zellsuspension vermischt, dann wurde 25 Min. bei 28.000 x g und 4 °C zentrifugiert: Um ein zu starkes Durchmischen während des Bremsvorgangs zu vermeiden, wurde auf eine aktive Abbremsung nach der Zentrifugation verzichtet. Die einzelnen Fraktionen wurden abgenommen, mit mindestens dem gleichen Volumen an Waschmedium versetzt und bei 470 x g und 4 °C 5 Min. lang zentrifugiert. Die einzelnen Fraktionen wurden unter dem Mikroskop auf Größe der Zellaggregate und Grad der Schädigung durch die Collagenasebehandlung untersucht. Um Percollreste zu entfernen wurde noch zweimal mit Waschmedium gewaschen, bevor die geeigneten Fraktionen vereinigt und auf 2 ml aufgefüllt wurden. Nach der Entnahme eines

20 µl-Aliquots wurde noch einmal zentrifugiert, um die Zellen auf 2,3 ml des BSA-haltigen Inkubationsmediums umzustellen. Die Zellsuspension wurde in vier 500 µl-Aliquots aufgeteilt, von denen jedes Aliquot mit einem anderen radioaktiv markierten Protein inkubiert wurde.

3.4.3 Import

Die 500 µl-Aliquots mit ihren verschiedenen Reninkonstrukten wurden mit Inkubationsmedium auf 1,1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und 90 Min. lang in 24er-Gewebekulturplatten bei 37 °C, unter Schütteln und Carbogenbegasung im Wasserbad inkubiert. Dann wurden die Ansätze halbiert und jeweils eine Hälfte 15 Min. lang mit 50 µg Proteinase K (ICN Biomedicals, Eschwege) auf Eis inkubiert, worauf durch Zugabe von 1 mM PMSF die Enzymaktivität inhibiert wurde. Die andere Hälfte der Ansätze blieb unbehandelt.

Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation über 5 Min. bei 470 x g und 4 °C sedimentiert, die Pellets wurden noch einmal mit Inhibitormedium gewaschen, für die Gelelektrophorese in je 40 µl 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert und 2 Min. lang auf 95 °C erhitzt. Auf die Polyacrylamidgele wurde ein Viertel dieses Ansatzes aufgetragen, was etwa 100 µg Protein entsprach.

Die Überstände wurden durch Zugabe der 4fachen Menge Aceton über 20 Min. bei -20 °C gefällt, dann wurde bei 8.000 UPM und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurden die Pellets für die Gelelektrophorese in je 50 µl 2 x Laemmli-Puffer resuspendiert und 2 Min. lang auf 95 °C erhitzt. Ein Fünftel des Ansatzes wurde über ein Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die zum Größenvergleich mit aufgetragenen in vitro Translationsprodukte wurden vor der Aufnahme in Auftragspuffer 1:10 verdünnt.

Neben einer Auswahl an Reninkonstrukten wurde auch den Einfluß verschiedener Substanzen auf die Aufnahme untersucht. So wurde für die Überprüfung des Reaktionsmechanismus Concanavalin A (ICN Biomedicals, Eschwege) in einer Endkonzentration von 0,25 mg/ml und Ammoniumchlorid in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt.

Außerdem wurden Peptide mit den Anfangssequenzen von Rattenprorenin und dem Ren2-Prorenin der Maus, jeweils in einer Konzentration von 1 µg pro ml Ansatz, verwendet. Das vom Rattenrenin abgeleitete Peptid 789 hatte die Aminosäuresequenz LPTDTASFGRILLKK, das vom Ren2-Renin der Maus abgeleitete Peptid 790 die Sequenz LPTGTTFERIPLKK.

Auch der Einfluß von aus Rattennieren aufgereinigtem aktivem Renin (R2) wurde untersucht. Hier wurden 14,8 ng Renin pro Ansatz zugesetzt.

Schließlich wurde Mannose-6-phosphat in einer Konzentration von 10 mM zugeben.

3.4.4 MTT-Test

Dieser kolorimetrische Test, der auf ein Experiment mit Lymphozyten zurückgeht (Mosmann, 1983), gibt Auskunft darüber, wie viele Zellen der untersuchten Suspension intakt sind. Die gemessene optische Dichte reflektiert die intrazelluläre Reduktion des gelben, wasserlöslichen MTT-Tetrazolium-Salzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zum korrespondierenden violetten, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff (Mosmann, 1983). Der Farbstoff löst sich nur in organischen Lösungsmitteln, besonders DMSO erwies sich als gut geeignet (Twentyman und Luscombe, 1987). Die Reduktion selbst geschieht in den Mitochondrien, gekoppelt an NADPH- und NADH-abhängige Redoxprozesse. Eine solche mitochondriale Umsetzung ist nur in intakten Zellen möglich, d. h. je mehr abgestorbene Zellen eine Kultur enthält, desto niedriger fällt der Wert für die gemessene optische Dichte aus.

Das MTT-Salz (Sigma, Deisenhofen) wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in HAM's F12 (Life Technologies, Karlsruhe) gelöst und sterilfiltriert. In Mikrotiterplatten wurde je 200 µl Kardiomyozytensuspension in Inkubationsmedium mit 20 µl MTT-Lösung gemischt und bei 37°C unter Lichtausschluß und Schütteln mit und ohne CO₂-Begasung über verschiedene Zeiträume (1,2 und 3 Stunden) inkubiert. Dabei wurden die nicht begasten Platten mit Parafilm luftdicht verschlossen. Als Blank diente HAM's F12-Medium, dem ebenfalls MTT zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurden die Proben in 0,5 ml-Eppendorff-Gefäße umpipettiert und 5 min. lang bei 470 x g zentrifu-

giert. Nichttransformiertes MTT wurde mit dem Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl DMSO gelöst, die nun gefärbte Lösung wieder in Mikrotiterplatten überführt und nach 5-minütigem Schütteln im ELISA-Photometer (Flow Laboratories) bei Wellenlängen von 540 und 620 nm gemessen (Gomez *et al.*, 1996).

3.5 Proteingele

3.5.1 Gelelektrophorese von Proteinen

Lösungen:

Sammelgel:	5% (w/v) Acrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, ICN Biomedicals, Eschwege) 1x Sammelgelpuffer 0,001% (v/v) TEMED 0,05% (w/v) APS
Trenngel:	12,5% (w/v) Acrylamid (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, ICN Biomedicals, Eschwege) 1x Trenngelpuffer 0,0067% (v/v) TEMED 0,067% (w/v) APS
5 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
5 x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS

Laufpuffer:	50 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS (pH von etwa 8,2 stellt sich selbst ein)
Auftragspuffer:	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 8% (w/v) SDS 40% (v/v) Glycerin 20% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,016% (w/v) BPB

Entscheidend für das Prinzip der diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) sind die pH-Diskontinuität zwischen Sammel- und Trenngel einerseits und die spezielle Ionenzusammensetzung des Laufpuffers andererseits. Die aufgetragenen Proteine werden daher im Sammelgel zunächst in schmalen Zonen konzentriert, dies führt zu schärferen Banden bei der Wanderung im Trenngel. Es wurden in der Regel Gele in der Größe von 20 x 20 x 0,1 cm verwendet, die aus einem Trenngel mit 12,5 %igem und einem Sammelgel mit 5 %igem Acrylamid bestanden. Pherographiert wurde über Nacht bei einer konstanten Spannung von 50 V. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele angefärbt und fluorographiert (vergl. Abschnitt 3.5.2).

3.5.2 Anfärbung und Fluorographie von Proteingelen

Lösungen

Färbelösung:	50% (v/v) Methanol 7% (v/v) Essigsäure 0,25% (w/v) Coomassie Brillant Blau (Serva, Heidelberg)
--------------	--

Entfärbelösung: 50% (v/v) Methanol
 7% (v/v) Essigsäure

Waschlösung: 10% (v/v) Methanol

Salicylatlösung: 10% (v/v) Methanol
 16% (w/v) Salicylat

Die Färbung mit Coomassie Brillant Blau weist in Polyacrylamidgelen noch etwa 0,3-1 µg Protein pro Bande nach (Oakley *et al.*, 1980). Die Gele wurden nach Abschluß der Elektrophorese 30-45 Min. lang unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert. Unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung wurden die Gele solange entfärbt, bis sich die Banden deutlich vom Gelhintergrund abhoben. Zur Fluorographie (Chamberlain 1979) wurden die Gele dann zweimal 20 Min. lang in der Waschlösung gewässert und 20 Min. lang in der Salicylatlösung inkubiert. Anschließend wurden die Gele getrocknet und mit einem Röntgenfilm (Ray Max Universal von ICN Biomedicals, Eschwege) bei -70 °C exponiert. Die Expositionszeiten waren bei den Importgelen sehr lang, sie lagen zwischen 3 Wochen und 2 Monaten.

3.6 RT-PCR

3.6.1 RNA-Isolation

Lösungen

Homogenisierungspuffer: 3 M LiCl
6 M Harnstoff
10 mM Natriumacetat pH 5,0
200 mg/l Heparin

Unmittelbar vor Gebrauch SDS in einer Endkonzentration von 0,1% zusetzen.

Waschpuffer: 4 M LiCl
8 M Harnstoff

SP-SDS-Puffer: 50 mM Natriumacetat pH 5,0
1% (w/v) SDS
0,1% (v/v) DEPC

Phenol-Chloroform in SP-SDS (1l):

250 g Phenol
250 ml Chloroform
62,2 ml H₂O
500 ml SP-SDS-Puffer
1 g 8-Hydroxy-Chinolin

Für die RNA-Isolation aus Geweben wurden die LiCl-/Harnstoffmethode (Auffray und Rougeon, 1980) verwendet. Die Gewebe wurden nach der Organentnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Sie wurden auf Trockeneis transportiert. Pro Gramm Gewebe wurden 20 ml Homogenisierungspuffer verwendet. Das gefrorene Organ wurde in den Puffer gegeben, und, nach Zugabe von 1/100 des Volumens an 10%igem SDS, sofort homogenisiert. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und am folgenden Tag 30 Min. lang bei 20.000 UPM (Sorvall, SS-34-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 5 ml Waschpuffer gewaschen, wobei sorgfältig resuspendiert wurde. Schließlich wurde das Pellet im 2,5-fachen Volumen SP-SDS pro Gramm Gewebe resuspendiert.

Nach Zugabe des gleichen Volumens Phenol-Chloroform in SP-SDS-Puffer wurde kurz gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch eine 20minütige Zentrifugation bei 14.000 UPM in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde noch einmal mit Chloroform extrahiert und die RNA schließlich mit Ethanol gefällt. Sie wurde entweder als Gesamtansatz oder in jeweils benötigten Portionen sedimentiert, mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

In manchen Fällen wurde aus der isolierten Gesamt-RNA zusätzlich mRNA extrahiert. Dazu wurden Oligo dT- Säulen (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet, die RNA mit einem PolyA-Überhang reversibel binden.

3.6.2 Qualitative und quantitative Bestimmungen

Eine Überprüfung der Ausbeute, der Qualität und eventueller Verunreinigungen durch Proteine oder genomische DNA erfolgte durch Gehaltsbestimmungen im Photometer und visuelle Kontrolle auf einem Agarosegel.

Photometermessung:

Der RNA-Gehalt und die Menge an verunreinigendem Protein wurde durch Messungen im Spektralphotometer Ultrospec® 2000 (Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Dabei wurde die entsprechend verdünnte RNA-Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen, 260 nm für eine optimale Absorption von RNA und 280 nm für die Proteinbestimmung. Der Reinheitsgrad wurde durch den Faktor $F = \text{Absorption}_{260 \text{ nm}} / \text{Absorption}_{280 \text{ nm}}$ bestimmt. Dieser Faktor sollte idealerweise nicht unter 1,5 liegen.

Agarosegelelektrophorese von RNA:

Die Elektrophorese wurde entsprechend der Agarosegelelektrophorese von DNA (vergl. Abschnitt 3.1.5) durchgeführt. Die verwendeten Kammern und Kämmen wurden nur für RNA-Gele benutzt um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Zur Qualitätsbestimmung wurde auf zwei deutliche Banden geachtet, die der 18 S- und der 28 S-RNA der Ribosomen entsprechen, wobei die größere stärker ausgeprägt sein sollte. Außerdem wurde das Gel auf Reste genomischer DNA überprüft.

3.6.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA verwendet. Dazu wurde eine entsprechende Menge der Ethanol-fällung sedimentiert, mit 80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Für die cDNA-Synthese wurde die Reverse Transkriptase Superscript-II (Life Technologies, Karlsruhe) gemäß den Herstelleranweisungen verwendet. In Gegenwart der vier Desoxynukleotide vervollständigt diese virale Reverse Transkriptase einen zur mRNA komplementären DNA-Strang, ausgehend von einem kurzen Stück komplementärer DNA, einem oligo-dT-Primer (ca. 3µM), der an das Poly-A-Ende der mRNA hybridisiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der keine Reverse Transkriptase enthielt. Alle Reaktionen wurden wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Nach Abschluß der Synthese wurde die cDNA entweder bei -20 °C gelagert oder direkt für die PCR verwendet.

3.6.4 PCR

Das Prinzip der PCR beruht auf der Vervielfältigung eines bestimmten Genabschnitts. Nach einer Hitzedenaturierungsphase mit 95 °C, die beide DNA-Stränge bzw. den RNA-Strang und den cDNA-Strang voneinander trennt, werden Reaktionsbedingungen gewählt, die eine Hybridisierung kurzer Stücke komplementärer DNA, den sense- und antisense-Primern, ermöglichen. Die Annealingtemperatur, also die optimale Anlagerungstemperatur für die Primer, wird für jedes Primergemisch individuell gewählt und an die jeweilige Primerschmelztemperatur angepaßt. Ausgehend von den Primern synthetisiert eine DNA-Polymerase in der Elongationsphase bei 72 °C jeweils einen Strang neu. Nun kann wiederum durch Hitze denaturiert und ein weiterer Reaktionszyklus eingeleitet werden. Auf diese Weise werden beispielsweise geringe cDNA-Mengen schwach exprimierter Gene solange kopiert, bis sie durch Ethidiumbromidfärbung auf einem Agarosegel sichtbar gemacht werden können.

Dieses Prinzip wurde einerseits genutzt, um kleine Mengen mRNA in Geweben zu detektieren und andererseits, um bestimmte Genabschnitte zu klonieren. Die Wahl der verwendeten Polymerasen war abhängig vom späteren Verwendungszweck. Während beim Nachweis geringer mRNA-Mengen eher eine möglichst hohe Amplifikationsrate gefragt war, stand beim Klonieren spezieller Gene die Lesegenauigkeit im Vordergrund. Die Pwo-DNA-Polymerase (Roche, Mannheim) wurde bei Reaktionen verwendet, die eine Polymerase verlangten, die das Auftreten von Basenaustausch und -deletion durch eine Korrekturlesefähigkeit minimiert. Für eine hohe Ausbeute an Kopien pro Zyklus, in Fällen, in denen Lesefehler eine untergeordnete Rolle spielten, erwies sich die Taq-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) als optimal. Beide Enzyme wurden gemäß den entsprechenden Herstellerprotokollen verwendet. Alle Reaktionen wurden im Mastercycler 5330 (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt.

Für Reaktionen nach dem Prinzip der PCR mit „nested“ Primern wurden jeweils zwei sense- und zwei antisense-Primer ausgewählt, die in unterschiedlichen Reaktionsstufen eingesetzt wurden. Zunächst wurden die beiden Primer verwendet, die weiter außen auf der Gensequenz lagen. Nach der ersten Runde wurde eine entsprechende Verdünnung dieser Reaktion in einer zweiten PCR mit den beiden innen gelegenen Primern hochamplifiziert.

Eine semiquantitative PCR, die relative Aussagen bezüglich der Mengen der einzelnen hochamplifizierten cDNAs erlaubte, wurde mit Hilfe einer internen Kontrolle möglich. Dazu wurde das ubiquitär vorkommende Transkript der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) verwendet. Auch hier wurde die PCR mit „nested“ Primern durchgeführt.

3.7 Zellkultur

3.7.1 Zellkultur mit HepG2-Zellen

Lösungen:

Nährmedium: Dulbeccos MEM/Ham's F12 (Verhältnis 1:1)
(Life Technologies, Karlsruhe)
10% FCS

Trypsin/EDTA: (Life Technologies, Karlsruhe) 1:10 verdünnt mit
modifizierter Hankscher Grundlösung

HepG2-Zellen benötigen alle zwei Tage einen Mediumwechsel, um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Sie wachsen sehr gut auf der Oberfläche von Kulturschalen oder -flaschen an, so daß eine spezielle Beschichtung überflüssig wird. Das Passagieren erfordert eine 5-minütige Inkubation mit Trypsin im Brutschrank, um die Zellen vom Untergrund abzulösen.

3.7.2 Transfektion in HepG2-Zellen

Für die Transfektion wurde das FuGENE-System von Roche (Mannheim) verwendet. Am vorhergehenden Tag wurden die Zellen gezählt und in einer Menge von $1,8 \times 10^5$ pro 60 mm-Platte ausgesät. Am nächsten Tag, nachdem 3 Stunden vor der Transfektion das Medium erneuert worden war, wurden 188 μl serumfreies Nährmedium mit 12 μl FuGENE-Reagenz vermischt. Nach der Zugabe von 4 μg DNA wurde 15 bis 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zu Medium und Zellen in die Kulturschalen gegeben und vorsichtig verteilt. Nach einem erneuten Mediumwechsel am dritten Tag wurde die Substanz G418 (Geneticin) (ICN Biochemicals, Eschwege) in einer Konzentration von 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugeben, um alle nicht transfizierten Zellen aus der Kultur zu entfernen.

4 Material

4.1 Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Riedel-de Haen (Seelze) und ICN Biomedicals (Eschwege) bezogen. Restriktionsenzyme und Nucleosidtriphosphate stammten von Promega (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach), Radiochemikalien wurden von ICN Biomedicals (Eschwege) bezogen. Weitere spezielle Chemikalien, Enzyme, Kits und sonstige Materialien sind bei den entsprechenden Methoden gesondert angegeben.

4.2 DNA-Längenstandards

Als DNA-Längenstandard diente die 1 Kb DNA-Leiter von Life Technologies, Karlsruhe.

4.3 Molekulargewichtsmarker für Proteine

Das apparente Molekulargewicht von Proteinen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde anhand des SDS-7-Molekulargewichtsmarker der Firma Sigma (Deisenhofen) abgeschätzt:

- Albumin (Rind) 66.000 Da
- Albumin (Hühnerei) 45.000 Da
- Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Kaninchen) 36.000 Da
- Carboanhydrase (Rind) 29.000 Da
- Trypsinogen (Rind) 24.000 Da
- Trypsininhibitor (Sojabohne) 20.100 Da
- -Lactalbumin (Rind) 14.200 Da

4.4 Vektoren und Wirtsstämme

Klonierungsvektoren:

- Bluescript M13⁻ (Stratagene, La Jolla USA)
- pcDNA3 (Invitrogen, Leek, Niederlande)

Bakterienstämme:

- E.coli JM 109 (Stratagene, La Jolla USA)
- E.coli JM 110 (Stratagene, La Jolla USA)
- E.coli DH5 α (Stratagene, La Jolla USA)

4.5 Versuchstiere

- Sprague-Dawley Ratten
- TGR(mREN2)27 (Max-Delbrück-Zentrum, Berlin)

4.6 Primer für die PCR

4.6.1 mRNA-Nachweis

Primer für (Ren2)Präprorenin der Maus

sense

Ren29: 5'-TCAGTCTCCCAACGGGCACCA-3' (Nukleotid 99-119, nach Panthier *et al.*, 1982)

Ren16: 5'-ATGTCTTCCTTGACTGATCT-3' (Nukleotid 227-246)

antisense

Ren30: 5'-GGCCTTAGCGGGCCAAGGCGAA-3' (Nukleotid 1229-1250)

Ren27: 5'-CCACTGTGCACAGCTTGTCTC-3' (Nukleotid 1098-1118)

Primer für Rattenpräproreninsense

Ren24: 5'-TCAGTCTCCCGACAGACACAG-3' (Nukleotid 91-111, nach Fukamizu *et al.*, 1988)

Ren28: 5'-GAAGTCTTCCTTTACCAAGT-3' (Nukleotid 4687-4706)

antisense

Ren25: 5'-GTCACTGGGTGACAGAGGAGC-3' (Nukleotid 10848-10868)

Ren26: 5'-CCAGTATGCACAGGTCATCGT-3' (Nukleotid 10699-10719)

Primer für Exon-1A Reninsense

Ren33: 5'-CTTGAATTTCCCCAGTCAGTG-3' (Nukleotid 3865-3885, nach Fukamizu *et al.*, 1988)

Ren23: 5'-GTGATGCATTGGAGGACAACACTG-3' (Nukleotid 3883-3904)

antisense

Ren25: 5'-GTCACTGGGTGACAGAGGAGC-3' (Nukleotid 10848-10868)

Ren22: 5'-GCATGATCAACTGCAGGGAGCTG-3' (Nukleotid 9601-9623)

Primer für GAP-DHsense

G3: 5'-ATGGTGAAGGTCCGGTGTGAA-3' (Nukleotid 84-103, nach Fort *et al.*, 1985)

G1: 5'-TGCCATCACTGCCACTCAGAAG-3' (Nukleotid 614-635)

antisense

G4: 5'-CTCCTTGGAGGCCATGTAGG-3' (Nukleotid 1063-1082)

G2: 5'-CATAACCAGGAAATGAGCTTCAC-3' (Nukleotid 999-1020)

4.6.2 cDNA-Klone**Primer für Maus(Ren2)-cDNA**sense

Ren869: 5'-CCTTGGCTGAACCAGATGGACAGG-3' (Nukleotid 26-49, nach Panthier *et al.*, 1982)

antisense

Ren30: 5'-GGCCTTAGCGGGCCAAGGCGAA-3' (Nukleotid 1229-1250)

Primer für V17 31/d (Prorenin (Ren2))sense

Ren17: 5'-GTCCTATGACCTTCAGTCTCC-3' (Nukleotid 87-107; Basenaustausch 92, T gegen A; Basenaustausch 93, G gegen T; Basenaustausch 94, C gegen G)

antisense

Ren30: 5'-GGCCTTAGCGGGCCAAGGCGAA-3' (Nukleotid 1229-1250)

Primer für V18 39/d (aktives Renin (Ren2))sense

Ren18: 5'-CAAAGATGTCTTCCTTGACTG-3' (Nukleotid 222-242; Basenaustausch 228, G gegen T)

antisense

Ren30: 5'-GGCCTTAGCGGGCCAAGGCGAA-3' (Nukleotid 1229-1250)

4.6.3 Sonstige Verwendungszwecke**Primer für die cDNA-Synthese**

Ren21 (oligo-dT-Primer): 5'-T₍₁₈₎VN-3'

V: A,C oder G

N: A, C, G oder T

Primer für die Sequenzierungsense

M13f: 5'-GTAAAAGGACGGCCAGT-3'

Ren4: 5'-AAGTCATCTTTGACACG-3' (Nukleotid 330-346, nach Panthier *et al.*, 1982)

Ren11: 5'-CACCCCTGTCTTTGACCA-3' (Nukleotid 649-666)

Ren12: 5'-ATGCAAGCCCTGGGAGCC-3' (Nukleotid 947-964)

Ren2: 5'-GGGAAATCCTGGAGGAGCGGGGAG-3' (Nukleotid 159-182)

Ren14: 5'-GGTGACTGTGGGTGGAATCA-3' (Nukleotid 517-536)

Ren10: 5'-TGTTATGTCCCCCGTGGTCCTC-3' (Nukleotid 244-265)

antisense

M13r: 5'-AACAGCTATGACCATG-3'

5 Resultate

Die Existenz einer intrakardialen lokalen RAS-Aktivität ist inzwischen unbestritten. Das Effektorpeptid Angiotensin II scheint hier u.a. Herzfunktionen und pathophysiologische Vorgänge wie die Entwicklung einer Herzhypertrophie zu beeinflussen. Ob die Herzhypertrophie in Ren2-transgenen Ratten tatsächlich mit einer gesteigerten intrakardialen RAS-Aktivität in Verbindung gebracht werden kann, wurde im Vorfeld dieser Arbeit bereits untersucht. Der Ausgangspunkt für meine Studien war damit die Beobachtung unserer Arbeitsgruppe, daß in hypertrophen Herzen von Ren2-transgenen Ratten im Vergleich mit SD-Tieren intrazellulär erhöhte Konzentrationen von Prorenin und aktivem Renin auftraten. Interessanterweise war das intrakardiale Renin in den transgenen Tieren mit erhöhten Plasmaproreninspiegeln assoziiert, nicht jedoch mit erhöhten Plasmaspiegeln von aktivem Renin (Abb. 1 und Abb. 2). Diese Ergebnisse belegen eine erhöhte intrakardiale Reninaktivität in den Ren2-transgenen Ratten und unterstützten damit die These, nach der die Entwicklung einer Herzhypertrophie in diesen Tieren mit einem lokalen System im Herz in Verbindung gebracht wird. Ob der erhöhte intrakardiale Reningehalt der transgenen Tiere auf das erhöhte Proreninangebot in der Zirkulation oder eine gesteigerte de novo-Synthese zurückzuführen ist, war allerdings unklar.

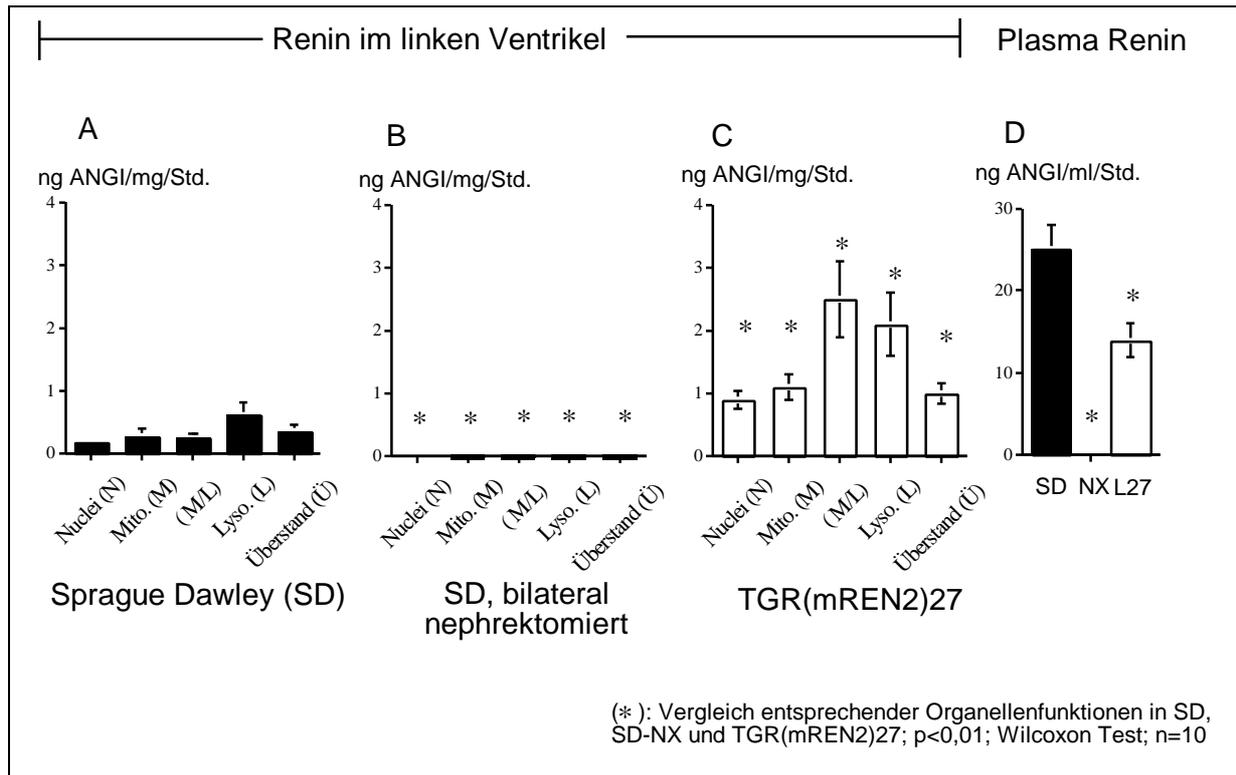


Abb. 1: Bestimmung der Reninaktivität vor und nach bilateraler Nephrektomie im Plasma, sowie in den Zellorganellen linker Ventrikel von Sprague-Dawley-Ratten (SD). Bestimmung der Reninaktivität im Plasma, sowie in den Zellorganellen linker Ventrikel von Ren2-transgenen Ratten (TGR(mREN2)27).

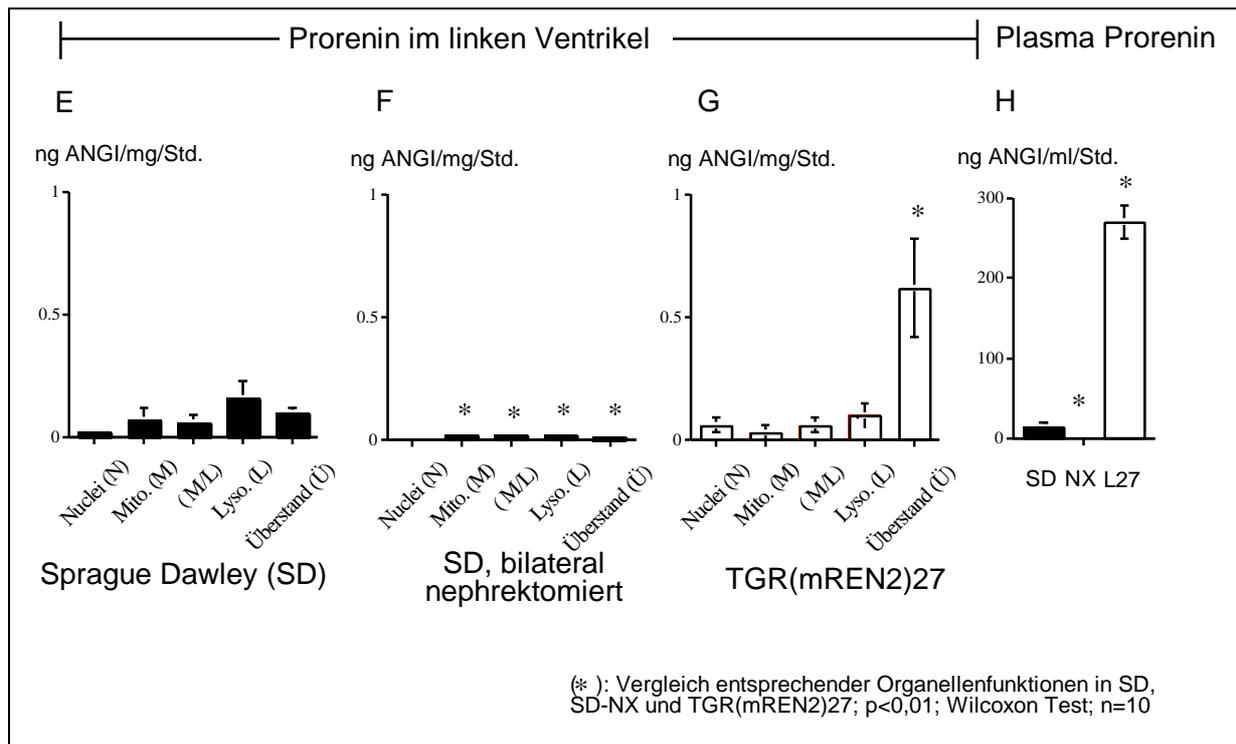


Abb. 2: Bestimmung der Proreninaktivität vor und nach bilateraler Nephrektomie im Plasma, sowie in den Zellorganellen linker Ventrikel von Sprague-Dawley-Ratten (SD). Bestimmung der Proreninaktivität im Plasma, sowie in den Zellorganellen linker Ventrikel von Ren2-transgenen Ratten (TGR(mREN2)27).

5.1 Reninexpression im Herz

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten für die Herkunft des intrakardialen Renins, zum einen eine Aufnahme von renal gebildetem Renin aus der Zirkulation und zum anderen eine de novo-Synthese im Herzgewebe selbst. Nachdem die Aussagen über eine eventuelle Reninexpression im Herz in der Vergangenheit kontrovers diskutiert wurden, wurde dieser Sachverhalt noch einmal anhand einer sehr empfindlichen Methode, der RT-PCR mit „nested“ Primern, überprüft.

5.1.1 Primerwahl

Für die Untersuchung der Reninexpression wurden Herzgewebe verschiedener Rattenstämme verwendet, nämlich Herzen von Sprague-Dawley-Ratten als Kontrollorgane und Herzen von TGR(mREN2)27, die zusätzlich das Ren2-Gen der Maus exprimieren und schnell eine Herzhypertrophie entwickeln. Die Primer wurden so ausgewählt, daß eine Differenzierung einerseits zwischen Rattenpräprorenin und Ren2-Präprorenin der Maus und andererseits zwischen Rattenpräprorenin und Exon 1A-Renin der Ratte möglich war. Exon 1A-Renin ist eine Reninvariante, die sich vom Präprorenin unterscheidet. Diesem Renin fehlt das Exon 1 des Rattenrenins, das die Sequenz für das Präfragment enthält. Es enthält stattdessen ein 80 Nukleotide langes Stück aus dem Intron 1. Die mRNA kodiert für ein verkürztes Prorenin, das anders als das bekannte Präprorenin der Ratte intrazellulär verbleibt, da es aufgrund des fehlenden Präfragments keinen Zugang zum sekretorischen Weg besitzt (Clausmeyer *et al.*, 1999). Welche der beiden Rattenreninvarianten zum intrakardialen RAS beiträgt, war bislang unklar.

Da die Sequenz des Rattenpräprorenins und des Ren2-Renins der Maus über das gesamte Transkript sehr ähnlich sind, mußte die Primerauswahl sorgfältig erfolgen. Für die Unterscheidung zwischen den beiden Rattenreninen wurden die sense-Primer so gewählt, daß sie im Exon 1 bzw. im Exon 1A lagen. Die antisense-Primer waren natürlich identisch, da sich beide Varianten nur vor dem Exon 2 unterscheiden (Abb. 3). Die Amplifikation über zwei PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primerpaaren erlaubt den Nachweis geringer mRNA-Mengen ohne dabei unspezifische Produkte in Kauf nehmen zu müssen. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden darüber hinaus stets kloniert und durch Sequenzierung überprüft.

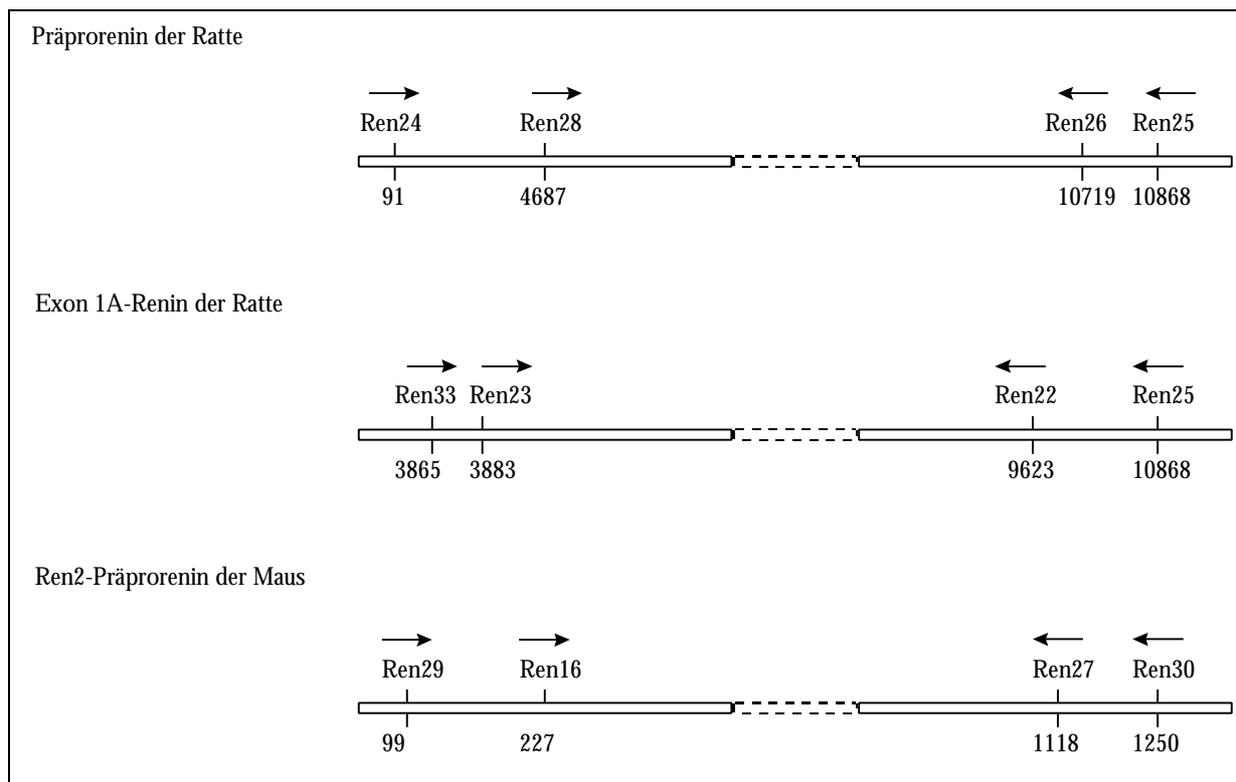


Abb.3: Anordnung der „nested“ Primer für die differentialdiagnostische RT-PCR auf der cDNA-Sequenz der verschiedenen Renintranskripte. Die Nukleotidnummerierung erfolgte nach Fukamizu *et al.* (1988) bzw. Panthier *et al.* (1982).

Für eine Untersuchung der Reninexpression bot sich besonders der linke Ventrikel an, der sich bei einer Herzhypertrophie am stärksten vergrößert. Abgesehen davon waren auch die intrakardialen Reninmessungen in linken Ventrikeln vorgenommen worden. Sowohl von Kontrolltieren als auch von Ren2-transgenen Ratten wurde RNA aus den linken Ventrikeln isoliert. Um Verunreinigungen durch Reste genomischer DNA auszuschließen, wurden die cDNA-Synthesen durch Negativkontrollen ergänzt, die kein Enzym für die reverse Transkription enthielten. In diesen Ansätzen konnte demnach keine cDNA zum Vervielfältigen vorhanden sein.

Für den Nachweis von Rattenpräprorenin wurden die beiden sense-Primer Ren24 und Ren28 und die beiden antisense-Primer Ren25 und Ren26 verwendet. Exon 1A-Renin wurde mit Hilfe der sense-Primer Ren33 und Ren23 und der antisense-Primer Ren25 und Ren22 amplifiziert. Die spezifischen Primer für das Ren2-Renin der Maus waren Ren29 und Ren16 als sense-Primer, und Ren30 und Ren27 als antisense-Primer (Abb. 3). Die

entsprechenden Primersätze wurden so gewählt, daß keine Kreuzreaktionen mit den beiden anderen Reninen auftraten (Abb. 4).

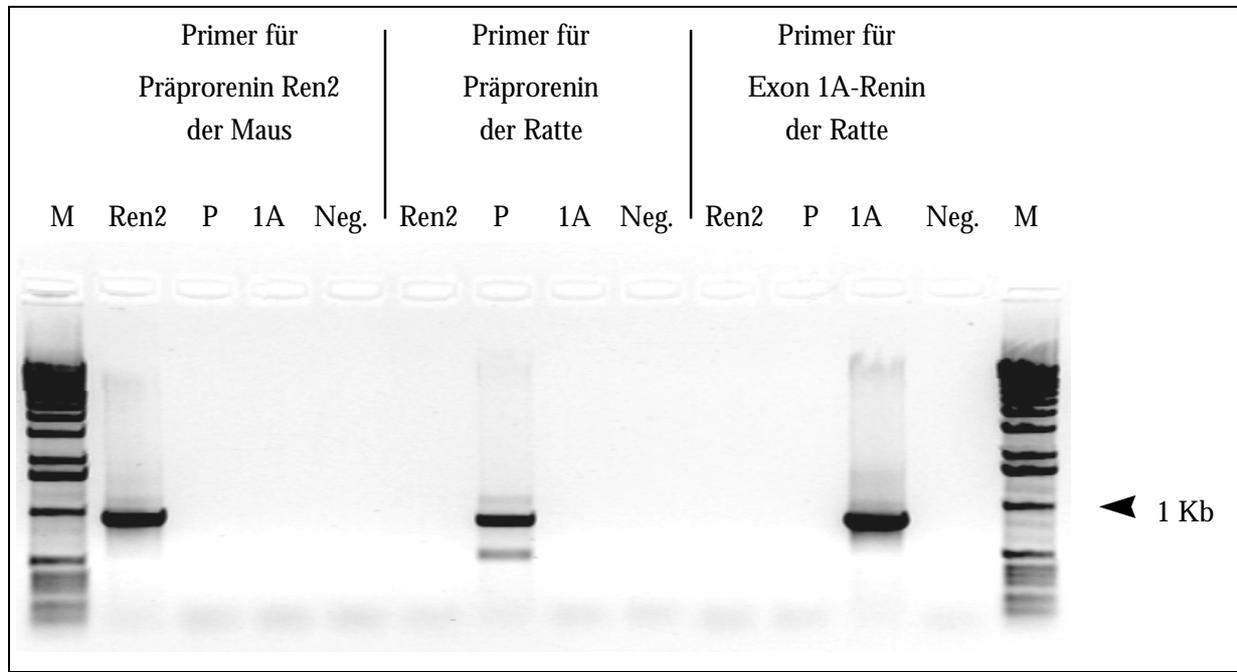


Abb. 4: Kontrolle der Spezifität der einzelnen Primerkombinationen für die differential-diagnostische RT-PCR für das jeweilige Transkript und Ausschluß von Kreuzreaktionen. Diese PCR wurde mit von den entsprechenden cDNAs abgeleiteten Plasmiden für Ren2-Präprorenin, Präprorenin der Ratte und Exon 1A-Renin der Ratte durchgeführt. Die „nested“ Primer wurden jeweils mit den drei Reninplasmiden kombiniert und zusätzlich in einer Negativkontrolle (Neg.), die kein Plasmid enthielt, auf Kontaminationen überprüft. Das Foto des ethidiumbromidgefärbten Agarosegels wurde invertiert. Ren2: Plasmid mit einem Insert des Ren2-Präprorenins der Maus; P: Plasmid mit einem Insert des Präprorenins der Ratte; 1A: Plasmid mit einem Insert des Exon 1A-Renins der Ratte; M: Molekulargewichtsmarker.

Zunächst wurden die beiden äußeren Primer für eine PCR über 30 Zyklen verwendet, dabei lag die optimale Annealingtemperatur für Rattenpräprorenin und Ren2-Renin der Maus bei 60 °C und für Exon 1A-Renin bei 55 °C. Die cDNAs wurden 1:20 verdünnt. Bei dieser cDNA-Konzentration war einerseits die Verdünnung der Salze aus der cDNA-Synthese groß genug, um die PCR nicht zu stören, auf der anderen Seite war die cDNA-Konzentration hoch genug um ausreichend Matrizen für die Vervielfältigung bereitzustellen. Für die zweite PCR wurde eine 1:50-Verdünnung der ersten Runde verwendet. Hier lag die ideale Annealingtemperatur für alle Primerkombinationen bei 60 °C. Die Mg^{2+} -Konzentration lag für alle PCRs optimalerweise bei 1,5 mM.

Es zeigte sich, daß Rattenrenin im linken Ventrikel nur in Form des Exon 1A-Renins exprimiert wird (n=4), Präprorenin-mRNA konnte in keinem Fall, auch bei der Überprüfung der RNA aus kompletter Herzen (n=40, verschiedene Rattenstämme), nachgewiesen werden. In Ren2-transgenen Tieren kommt es außerdem zu einer Expression von Ren2-Renin im linken Ventrikel (n=5) (Abb. 5).

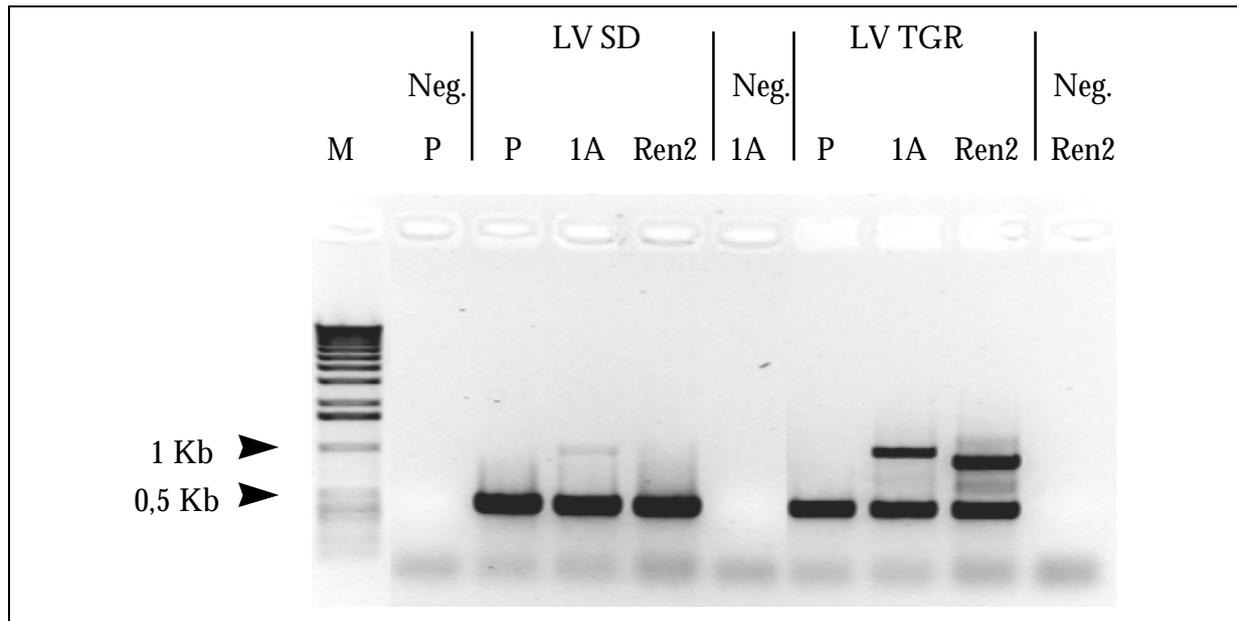


Abb. 5: Überprüfung der Expression von Präprorenin der Ratte, Exon 1A-Renin der Ratte und Ren2-Präprorenin der Maus in den linken Ventrikeln von Sprague-Dawley-Ratten (SD) und Ren2-transgenen Ratten (TGR). Das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel zeigt die in einer RT-PCR mit „nested“ Primern vervielfältigte cDNA. Alle Primerkombinationen wurden durch Negativkontrollen (Neg.), die keine cDNA enthielten, auf Kontaminationen überprüft. GAP-DH-Primer (resultierendes Fragment: ca. 0,4 KB) wurden zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen zugefügt. Das Foto wurde invertiert.

P: spezifische Primer für Präprorenin der Ratte; 1A: spezifische Primer für Exon 1A-Renin der Ratte; Ren2: spezifische Primer für Ren2-Präprorenin der Maus; M: Molekulargewichtsmarker.

Für die Untersuchung von RNA aus allen Herzteilen wurden Herzen von SD- und Ren2-transgenen Ratten vor der RNA-Isolation in Atrium, sowie rechten und linken Ventrikel zerlegt. Die RT-PCR mit RNA aus den jeweiligen Organteile konnte, wie bereits erwähnt, in keinen Herzteil Transkript detektieren, das für Rattenpräprorenin kodierte. Bei den transgenen Tieren konnte die Expression des Ren2-Präprorenin der Maus in allen drei Herzteilen nachgewiesen werden. Exon 1A-Renin wurde in allen Herzteilen beider Rattenstämme exprimiert, wobei die Expression in den transgenen Tieren etwas stärker zu sein schien als in den SD-Tieren (Abb. 6 und Abb. 7). Um dieses Ergebnis näher zu untersuchen, wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt.

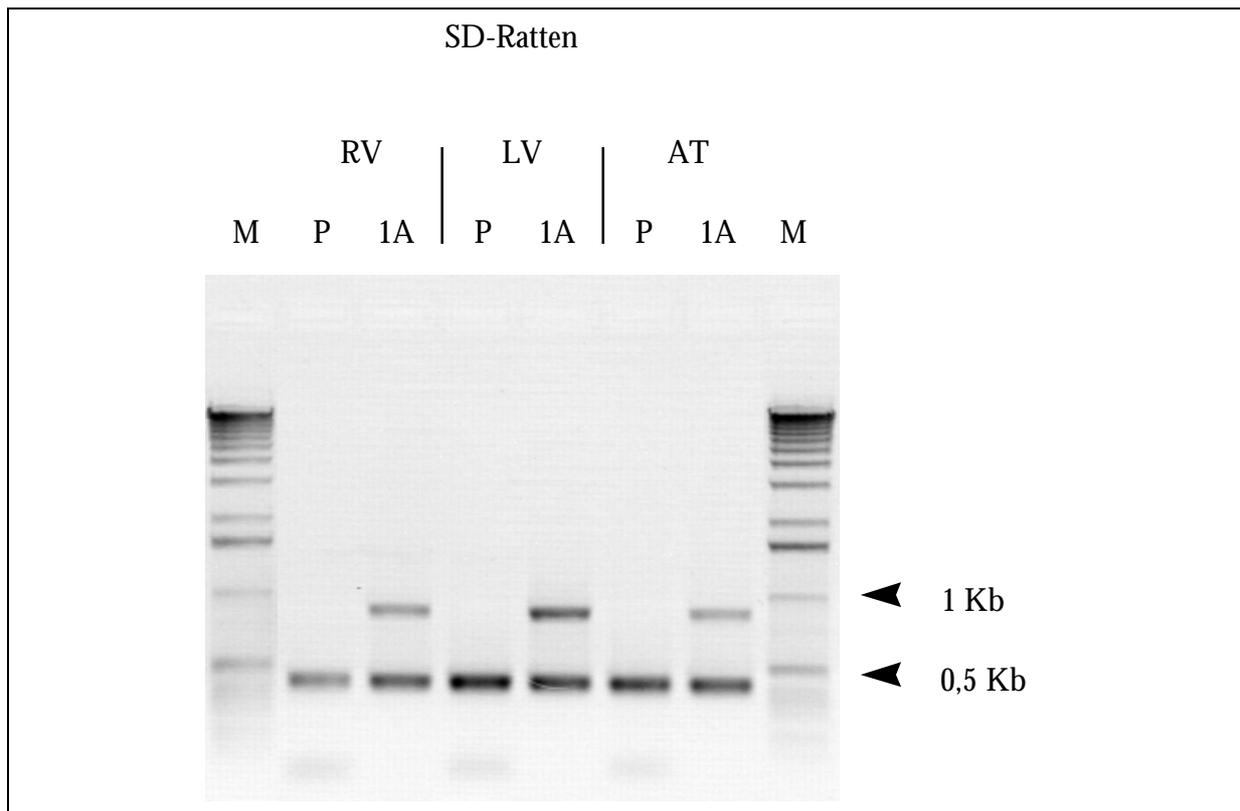


Abb. 6: Überprüfung der Expression von Präprorenin der Ratte und Exon 1A-Renin der Ratte in den ganzen Herzen von Sprague-Dawley-Ratten (SD). Das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel zeigt die in einer RT-PCR mit „nested“ Primern vervielfältigte cDNA. GAP-DH-Primer (resultierendes Fragment: ca. 0,4 KB) wurden zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen zugefügt. Das Foto wurde invertiert.

RV: rechter Ventrikel; LV: linker Ventrikel; AT: Atrium; P: spezifische Primer für Präprorenin der Ratte; 1A: spezifische Primer für Exon 1A-Renin der Ratte; M: Molekulargewichtsmarker.

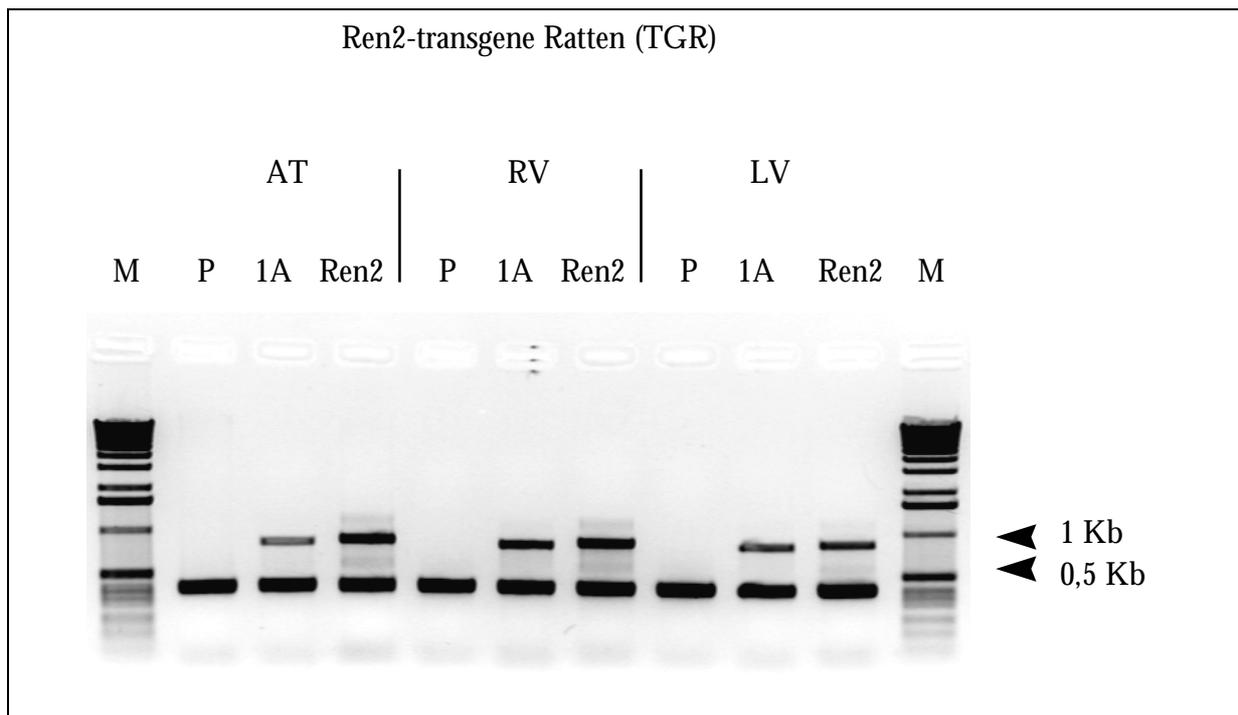


Abb. 7: Überprüfung der Expression von Präprorenin der Ratte, Exon 1A-Renin der Ratte und Ren2-Präprorenin der Maus in den ganzen Herzen von Ren2-transgenen Ratten (TGR). Das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel zeigt die in einer RT-PCR mit „nested“ Primern vervielfältigte cDNA. GAP-DH-Primer (resultierendes Fragment: ca. 0,4 KB) wurden zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen zugefügt. Das Foto wurde invertiert.

AT: Atrium; RV: rechter Ventrikel; LV: linker Ventrikel; P: spezifische Primer für Präprorenin der Ratte; 1A: spezifische Primer für Exon 1A-Renin der Ratte; Ren2: spezifische Primer für Ren2-Präprorenin der Maus; M: Molekulargewichtsmarker.

5.1.2 Semiquantitative RT-PCR

Sehr interessant war nun die Frage, ob sich die Reninexpression unter pathologischen Bedingungen verändert, beispielsweise bei einer Herzhypertrophie. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurde die Expressionsstärke von Renin in Ren2-transgenen Ratten mit der von SD-Ratten verglichen. Die transgenen Tiere stellen ein Hypertrophiemodell dar, bei dem auch die intrakardiale Reninkonzentration erhöht. Der mögliche Zusammenhang zwischen einem aktivierten intrakardialen RAS und der Entwicklung einer Herzhypertrophie wird seit einigen Jahren mit großem Interesse verfolgt.

Zu diesem Zweck wurde eine semiquantitative RT-PCR mit einem internen Standard entwickelt, die einen Vergleich der ursprünglich vorhandenen RNA-Mengen ermöglichen sollte. Abgesehen davon kann ein interner Standard unter Umständen Aufschluß über eventuelle Schwankungen in Menge der eingesetzten RNA geben, die z.B. durch Pipettierfehler entstehen können. Für solche semiquantitativen Bestimmungen wird der interne Standard neben der gesuchten cDNA im gleichen Ansatz vervielfältigt. Aus dem Mengenverhältnis zwischen beiden Amplifikaten ergibt sich eine relative Quantifizierbarkeit. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, mit einem internen Standard zu arbeiten. Entweder wird die Expressionsstärke des gesuchten Gens auf das Signal eines ubiquitär vorkommenden Gens bezogen, oder auf die Intensität eines eigens konstruierten Kontrollfragments, das in einer bekannten Konzentration zur RT-PCR zugesetzt wird. Ein ubiquitäres Gen erfordert eigene Primerpaare, während man für einen eigens hergestellten internen Standard in der Regel die Sequenz des untersuchten Gens soweit verkürzt, daß beide Signale auf einem Agarosegel unterschieden werden können. Beide cDNAs können so mit den gleichen Primern hybridisieren.

Beide Methoden sind nicht unproblematisch und haben Vor- und Nachteile. Bei der Verwendung des ubiquitären Gens haben beide Amplifikationsreaktionen durch die verschiedenen Primer unterschiedliche optimale Reaktionsbedingungen. Das resultiert vor allem aus der gewählten Annealingtemperatur, die für ein Primerpaar weniger geeignet sein kann als für das andere. Auf der anderen Seite beschränken sich eventuelle Konkurrenzreaktionen auf eine Konkurrenz um die Polymerase, da beide cDNAs ihre eigenen Primer haben. Die praktische Anwendung ist unkompliziert, da für den RT-PCR-Ansatz lediglich die RNA eingesetzt wird, die ohnehin untersucht werden sollte. Allerdings unter-

scheiden sich die Expressionsstärken von gesuchtem Gen und Kontrollgen oftmals so sehr, daß die Zyklenzahl des Kontrollansatzes verringert werden muß, um die Signale auf dem Gel vergleichen zu können. In diesem Fall werden die Primer des Kontrollgens später zugegeben, um der gesuchten cDNA einen gewissen Vorsprung zu geben.

Aber auch ein vom gesuchten Gen abgeleiteter interner Standard ist problematisch. Wird das Konstrukt als DNA eingesetzt, fehlt die Umsetzung in der reversen Transkription, was eine Quantifizierung unmöglich macht. Eine Transkription in RNA vor der Zugabe zur RT-PCR ist unerlässlich. Ein weiteres Problem ist die exakte RNA-Mengenbestimmung im Photometer, da schon kleinste Schwankungen in der RNA-Menge das Signal nach der PCR beeinflussen, besonders wenn es sich um eine „nested“ PCR handelt. Außerdem beschränken sich die Konkurrenzreaktionen während der Amplifikation nicht nur auf die Polymerase, sondern betreffen auch die gemeinsamen Primer. In der frühen Phase der Reaktion könnte bereits die zufällige Bevorzugung eines Transkripts bei der Primerhybridisierung das Endergebnis verfälschen.

5.1.2.1 Verkürztes Renin als interner Standard

Um einen deutlichen Größenunterschied zwischen den gesuchten cDNAs und der internen Kontrolle zu erhalten, wurden die cDNA-Klone beider Präprorenine durch Restriktionen um eine ca. 400 Bp umfassende Sequenz verkürzt. Für diese Sequenz wurde der mittlere Bereich der Gene gewählt, so daß die Anlagerungsstellen für die „nested“ Primer erhalten blieben. (Abb. 8).

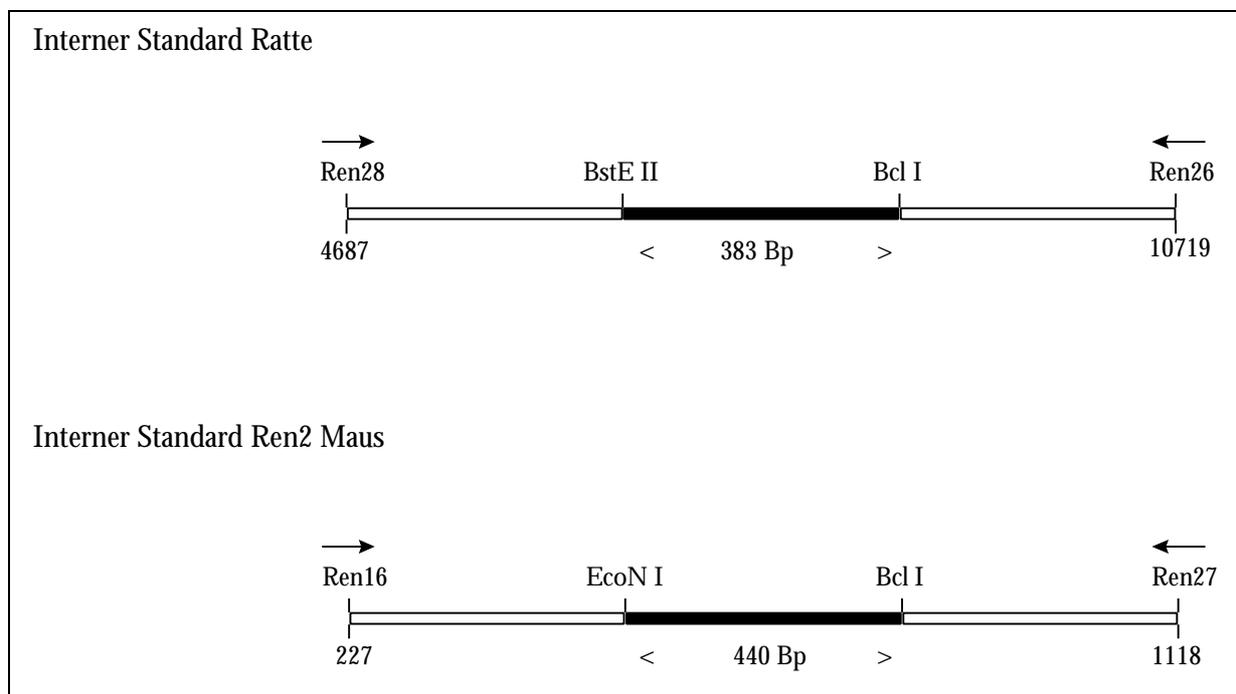


Abb. 8: Schema zur Konstruktion der internen Standards ausgehend vom Präprorenin der Ratte und vom Ren2-Präprorenin der Maus. Die PCR-Fragmente wurden durch Restriktionen um jeweils ca. 400 Bp verkürzt. Die Nukleotidnummerierung erfolgte nach Fukamizu *et al.* (1988) bzw. Panthier *et al.* (1982).

Ein interner Standard für Exon 1A-Renin sollte erst im Anschluß an einen erfolgreichen Einsatz der beiden Präproreninkonstrukte hergestellt werden. Im hinteren Bereich wurden beide Renine mit Bcl I, im vorderen Bereich dagegen wegen der Sequenzunterschiede in diesem Abschnitt das Präprorenin der Ratte mit BstE II und das Ren2-Präprorenin mit EcoN I geschnitten. Bei diesen Restriktionen muß beachtet werden, daß Bcl I an einer methylierten Schnittstelle nicht schneidet. Eine solche Methylierung wird von manchen Bakterienstämmen vorgenommen, wie von DH5 α oder JM 109, die üblicherweise in unserer Gruppe verwendet wurden. Eine erneute Transformation der Plasmide in Bakterien des Stammes JM 110 beseitigte das Problem. Die nach der Restriktion entstandenen Fragmente wurden über ein Agarosegel von den Restplasmiden abgetrennt und verworfen. Die überhängenden Enden der Plasmide wurden mit einer Klenow-Reaktion zu glatten Enden aufgefüllt, religiert und in Bakterien transformiert. Testrestriktionen und -PCRs bestätigten die korrekte Zusammensetzung der gewünschten internen Standards.

Die ersten „nested“ PCRs wurden mit cDNA aus der Nieren-RNA von Ren2-transgenen Ratten und den internen Standards als Plasmid in hoher Verdünnung durchgeführt. Es zeigte sich bald, daß die auftretenden starken Konkurrenzreaktionen sowohl von der Menge des zugesetzten internen Standards als auch von der Menge der cDNA abhing (Abb. 9). Um tatsächlich semiquantitative Untersuchungen durchzuführen, wären aufwendige Eichkurven zu jeder einzelnen RT-PCR nötig gewesen. Da außerdem die Verwendung eines ubiquitären Gens, die S. Clausmeyer zu diesem Zeitpunkt untersucht hatte, gute Ergebnisse erzielte, wurde beschlossen, die Versuche mit verkürzten Reninen als internem Standard an diesem Punkt einzustellen.

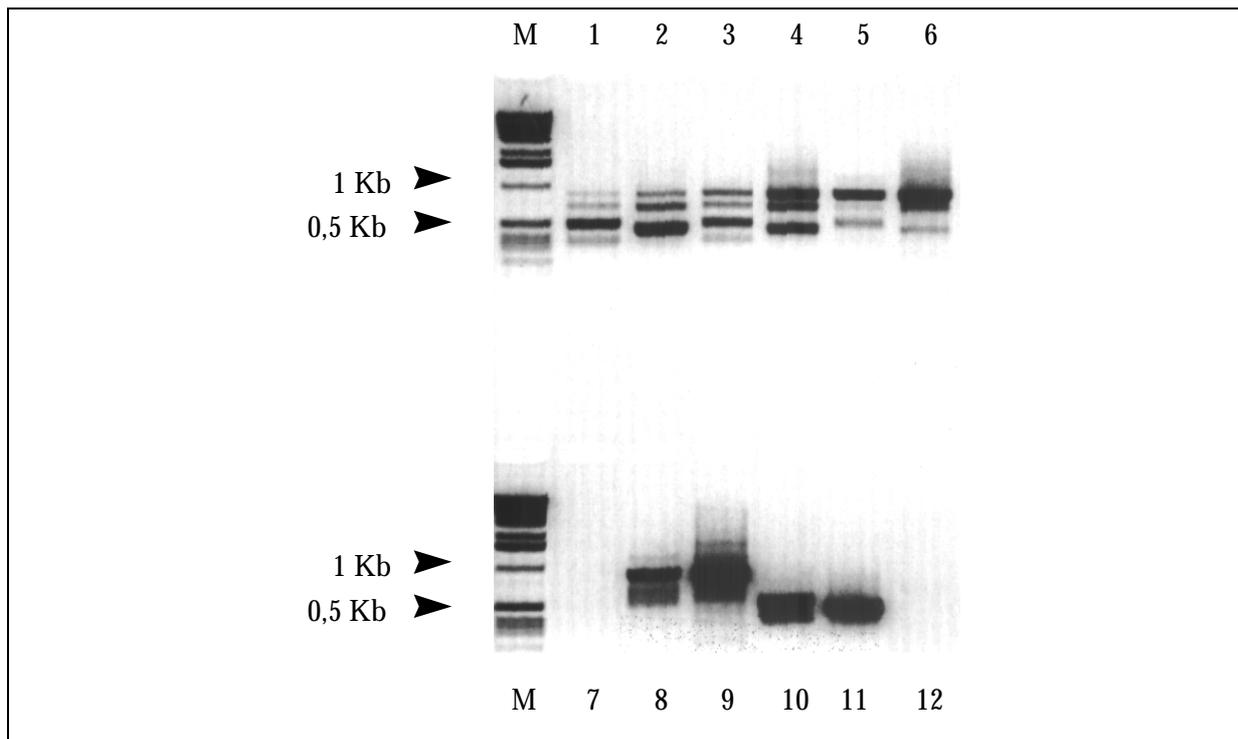


Abb. 9: PCR mit cDNA aus der Niere von Ren2-transgenen Ratten unter Zusatz der internen Standards für das Präprorenin der Ratte (ISR) und das Ren2-Präprorenin der Maus (ISM) in unterschiedlichen Konzentrationen. Spur 8 und 9 zeigen die cDNA ohne Zusätze, jeweils mit Primern, die für das Präprorenin der Ratte (8) und für das Ren2-Präprorenin der Maus (9) spezifisch sind. Spur 10 zeigt den internen Standard ISR, Spur 11 den internen Standard ISM. Ansätze mit dem internen Standard ISR wurden stets mit Primern angesetzt, die für Präprorenin der Ratte spezifisch waren, Ansätze mit dem internen Standard ISM entsprechend mit Ren2-Präprorenin-spezifischen Primern. Die Spuren 1 bis 6 enthalten sowohl cDNA als auch internen Standard. In den Spuren 7 und 12 sind weder cDNA noch Plasmid enthalten, sie dienen als Negativkontrollen für beide Primerkombinationen. Das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel zeigt die in einer PCR mit „nested“ Primern vervielfältigte cDNA bzw. das vervielfältigte Plasmidfragment. Das Foto wurde invertiert. M: Molekulargewichtsmarker.

Spur	Nieren-cDNA	ISR (verd.)	ISM (verd.)
1	+	1:10.000	-
2	+	-	1:10.000
3	+	1:100.000	-
4	+	-	1:100.000
5	+	1:1.000.000	-
6	+	-	1:1.000.000
7	-	-	-
8	+	-	-
9	+	-	-
10	-	1:10.000	-
11	-	-	1:10.000
12	-	-	-

5.1.2.2 GAP-DH als interner Standard

Die Verwendung eines ubiquitären Gens als Kontrollsignal für die RT-PCR bietet außer der Möglichkeit zu semiquantitativen Aussagen noch einen weiteren Vorteil. Es kommt immer wieder vor, daß geringe Schwankungen in der Menge der zur Reversen Transkription eingesetzten RNA oder Pipettierfehler bei der PCR selbst auftreten. Die Amplifikation einer in gleicher Konzentration in allen Körperzellen vorkommenden RNA erlaubt eine Nivellierung der verschiedenen Ansätze und cDNAs (Abb. 5, 6 und 7).

Als interner Standard wurde das Transkript der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) ausgewählt. Eine gleichmäßige Signalstärke in den GAP-DH-Banden erlaubte, die Intensitäten der Renin-Banden miteinander zu vergleichen. Die optimalen Reaktionsbedingungen für diese PCR wurden von S. Clausmeyer ermittelt. Da die Expression der verschiedenen Renine deutlich schwächer war als die der GAP-DH, wurden die GAP-DH-Primer in beiden Runden der „nested“ PCR erst zugegeben, nachdem die Renine schon über 10 Zyklen amplifiziert worden waren. Das Signal für die Reninexpression in den linken Ventrikeln von Ren2-transgenen Ratten war stärker als das in den Ventrikeln der SD-Ratten (Abb. 10). Die statistische Auswertung der Quotienten aus den Signalen für Exon 1A-Renin und den GAP-DH-Signalen, die in einer densitometrischen Auswertung ermittelt worden waren, ergab eine um den Faktor 2 bis 2,5 erhöhte Expression in den Ventrikeln der transgenen Tiere.

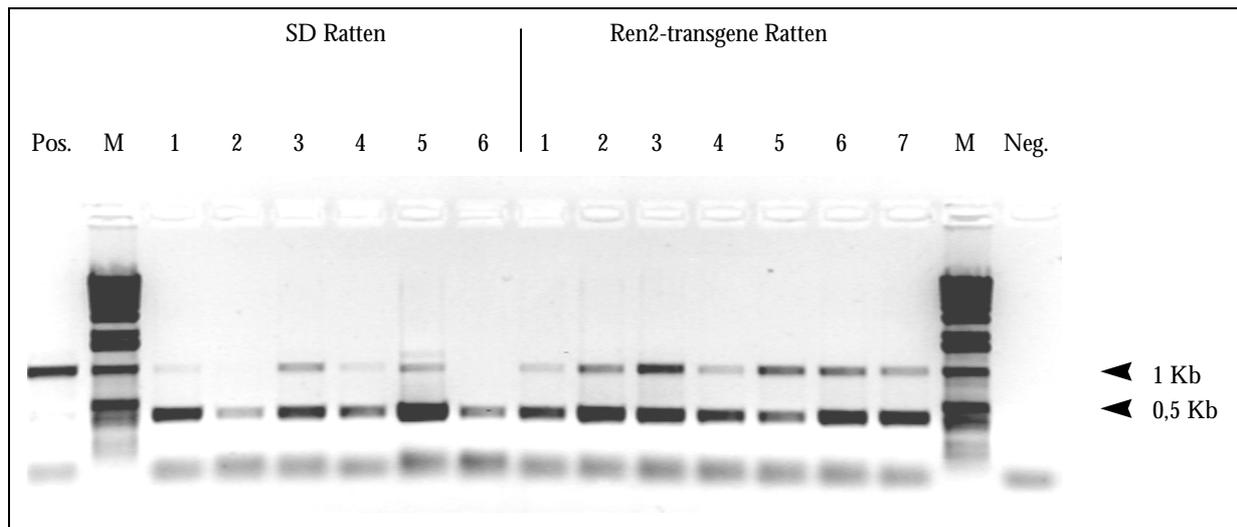


Abb.10: Semiquantitative Überprüfung der Expression von Exon 1A-Renin in linken Ventrikeln von Sprague-Dawley (SD) -Ratten (n=7) und Ren2-transgenen Ratten (n=6). Das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel zeigt die in einer RT-PCR mit „nested“ Primern vervielfältigte cDNA. Als Positivkontrolle diente cDNA aus der Nebenniere (Pos.), als Negativkontrolle ein Ansatz ohne reverse Transkriptase (Neg.). Die Expression von GAP-DH (resultierendes Fragment: ca. 0,4 KB) wurde als interner Standard verwendet. Das Foto wurde invertiert.
M: Molekulargewichtsmarker.

5.2 Aufnahmeexperimente in isolierte Kardiomyozyten

5.2.1 Isolation von Ren2-mRNA aus der Mausspeicheldrüse und Klonierung verschiedener Reninkonstrukte

Voraussetzung für systematische Aufnahmeuntersuchungen von Renin in Kardiomyozyten war die Verfügbarkeit verschiedener Renin-cDNA-Klone. Die Importversuche konzentrierten sich hierbei nicht allein auf eine mögliche Aufnahme von Rattenrenin sondern auch auf eine eventuelle Internalisierung des Ren2-Renins der Maus, das beim transgenen Modell der Ren2-transgenen Ratten eine besondere Rolle im lokalen RAS des Herzens zu spielen scheint.

Das Ren2-Gen kommt üblicherweise nicht in Mäusen vor, lediglich einige Mäusestämme besitzen dieses zusätzliche Reningen, das im Lauf der Evolution durch eine Genduplikation entstand (Mullins *et al.*, 1989). Die gewebsspezifische Expression von Ren1 und Ren2 sind unterschiedlich, Ren2 wird besonders in der Speicheldrüse exprimiert. Für eine RNA-Extraktion wurde die Speicheldrüse einer DBA/2-Maus verwendet. Nach anschließender PolyA⁺-Isolation und cDNA-Synthese wurde das Präproreninfragment durch eine PCR mit dem sense-Primer Ren869 und dem antisense-Primer Ren30 über 30 Zyklen vervielfältigt (Abb. 11). Dabei betrug die Annealingtemperatur mit der höchsten Ausbeute 65 °C. Die für diese Reaktion am besten geeignete Mg²⁺-Ionenkonzentration wurde ermittelt, indem die zugesetzte Ionenmenge ausgehend von 1 mM in Schritten von 0,5 mM bis auf 3 mM erhöht wurde. Hier wie auch bei allen anderen PCR-Reaktionen erwies sich eine Konzentration von 1,5 mM als optimal. Als Enzym wurde eine Pwo-DNA-Polymerase verwendet, um möglichst fehlerfreie Kopien der ursprünglichen Basensequenz zu erhalten.

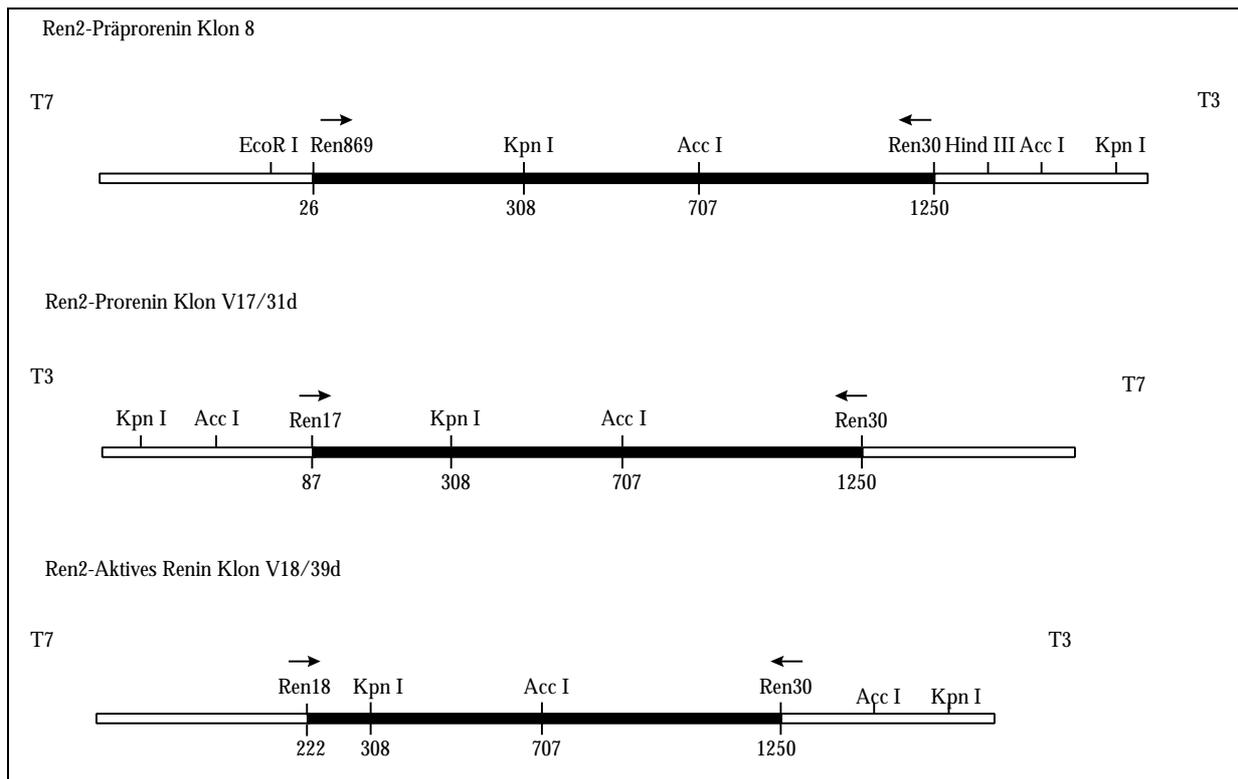


Abb. 11: Herstellung der Ren2-Reninkonstrukte für die Aufnahmeuntersuchungen. Für Ren2-Präprorenin, Ren2-Prorenin und aktives Ren2-Renin wurden entsprechende PCR-Fragmente hergestellt und kloniert. Testschnitte mit verschiedenen Restriktionsenzymen dienten zur vorläufigen Kontrolle.

Das PCR-Fragment wurde durch Testrestriktionen mit den Enzymen Kpn I (280 + 940 Bp) und Acc I (540 + 680 Bp) überprüft (Abb. 11). Es wurde an seinen glatten Enden mit einer PNK-Reaktion phosphoryliert, um eine Ligation mit den ebenfalls glatten Enden des dephosphorylierten, EcoR V-geschnittenen Bluescriptvektors zu ermöglichen. Die Klone wurden durch Testschnitte mit den Restriktionsenzymen Kpn I (T3-T7: Restplasmid + 340 Bp; T7-T3: Restplasmid + 990 Bp) und Acc I (T3-T7: Restplasmid + 710 Bp; T7-T3: Restplasmid + 570 Bp), sowie der Kombination EcoR I/Hind III vorselektiert. Bei der Enzymkombination wurde das gesamte Insert mit einer Länge von ca. 1220 BP aus dem Plasmid geschnitten. Die Basenfolge selbst wurde im Anschluß durch Sequenzierung überprüft.

Um eine mögliche Aufnahme von zirkulierendem Renin ins Herz zu überprüfen, wurden die beiden Produkte der proteolytischen Verkürzungen am Präprorenin benötigt, die im Blut auftreten, nämlich Prorenin und aktives Renin. Vom Präprorenin der Ratte und der Maus wurden jeweils Deletionen hergestellt und kloniert, die Prorenin und aktivem Renin entsprachen. Die entsprechenden vom Rattenrenin stammenden cDNA-Klone wurden von S. Clausmeyer zur Verfügung gestellt (Abb. 12). Darunter befand sich mit dem Protein D36 noch eine weitere Deletionsvariante, die dem verkürzten Prorenin entspricht, für das die Exon 1A-Renin-mRNA kodiert (Abb. 12). Für die Ren2-Deletionen wurden ausgehend von Präprorenin-cDNA-Klon8 des Ren2-Gens mit geeigneten Primern verkürzte Konstrukte synthetisiert, die in ihrer Basensequenz Prorenin und aktivem Renin entsprachen. Der antisense-Primer war in beiden Fällen Ren30, für die Synthese des Proreninfragments wurde Ren17 verwendet und für die des aktiven Renins Ren18. Um eine spätere *in vitro* Translation zu ermöglichen, wurde in den beiden sense-Primern jeweils die Basensequenz für ein Methionin eingefügt (Abb. 12). Die Annealingtemperatur lag bei beiden Kombinationen bei 60 °C, es wurde wieder über 30 Zyklen mit der Pwo-DNA-Polymerase amplifiziert. Die entstandenen PCR-Fragmente wurden durch Testrestriktionen mit den Enzymen Kpn I (Prorenin: 940 + 320 Bp; aktives Renin: 940 + 90 Bp) und Acc I (Prorenin: 540 + 620 Bp; aktives Renin: 540 + 490 Bp) kontrolliert. Nach einer Behandlung mit PNK wurden sie in einen durch EcoR V linearisierten und CIP-behandelten Bluescriptvektor ligiert. Die Klone wurden durch eine Testrestriktion mit der Enzymkombination Kpn I/Acc I (Prorenin: Restplasmid + 400 Bp + 240 Bp (T3-T7)/560 Bp (T7-T3) + (30 Bp); aktives Renin: Restplasmid + 400 Bp + 110 Bp (T3-T7)/560 Bp (T7-T3) + (30 Bp)) vorselektiert, und durch Sequenzierung überprüft.

Rattenrenin:	
Präprorenin:	MGGRRMPLWALLLLWTSCSFLPTDTASFGRILLKKMPSVREILEERGVDMTRISA EWGEFIKKSSFTNVTSPVVLT...
Prorenin:	<u>M</u> ASFGRILLKKMPSVREILEERGVDMTRISA EWGEFIKKSSFTNVTSPVVLT...
Protein D36:	MPSVREILEERGVDMTRISA EWGEFIKKSSFTNVTSPVVLT...
Aktives Renin:	<u>M</u> SPVVLT...
 Ren2-Renin der Maus:	
Präprorenin:	MDRRRMPLWALLLLWSPCTFSLPTGTTFERIPLKKMPSVREILEERGVDMTRLSAEWDVFTKRSSLTDLISPVVLT...
Prorenin:	<u>M</u> TFSLPTGTTFERIPLKKMPSVREILEERGVDMTRLSAEWDVFTKRSSLTDLISPVVLT...
Aktives Renin:	<u>M</u> SSLTDLISPVVLT...

Abb. 12: Aminosäuresequenzen von Präprorenin, Prorenin und aktivem Renin der Ratte sowie von Protein D36, einer Deletionsvariante, die dem Exon 1A-Renin entspricht. Aminosäuresequenzen von Ren2-Präprorenin, Ren2-Prorenin und aktivem Ren2-Renin der Maus. Zusätzlich eingefügte Methionine, die eine in vitro Translation ermöglichten, sind durch M hervorgehoben.

Für die Sequenzierung der verschiedenen Klone wurden 7 unterschiedliche Primer verwendet, die über den gesamten Präproreninbereich sowie einen Teil des Vektors verteilt waren. Sie erlaubten eine lückenlose Kontrolle des klonierten Genabschnitts und gaben zusätzlich Auskunft über die jeweilige Orientierung des Inserts in die EcoR V-Schnittstelle. Von den Ren2-Präproreninklonen waren 3 Klone ohne Lesefehler, Klon2 (T7/T3), Klon7 (T3/T7) und Klon8 (T7/T3). Für die Synthese der Deletionen wurde Klon8 verwendet. Von diesen Verkürzungen war jeweils ein Klon ohne Lesefehler geblieben, der Klon V17/31d (T3/T7), der für Prorenin, und der Klon V18/39d (T7/T3), der für aktives Renin kodierte (Abb. 11).

5.2.2 In vitro Transkription und in vitro Translation

Je nach Orientierung der Klone wurden die Restriktionsenzyme für die Linearisierung und die DNA-abhängige RNA-Polymerase für die in vitro Transkription gewählt. Bei einer T3/T7-Orientierung wurde mit BamH I geschnitten und mit der T3-RNA-Polymerase transkribiert, bei einer T7/T3-Orientierung wurden entsprechend Hind III und T7-RNA-Polymerase verwendet. Diese in vitro Transkriptionsansätze wurden zunächst durch Testtranslationen auf eine gute Translatierbarkeit hin überprüft, bevor sie für die größeren Importansätze verwendet wurden.

5.2.3 Kardiomyozytenisolation

Die meisten Kardiomyozytenprimärkulturen gehen von neonatalen oder fetalen Geweben aus. Für die Importversuche war die Verwendung dieser jungen Tiere nicht gut geeignet, da sich ihre Genexpression von der adulter Tiere unterscheidet. Vor allem im Hinblick auf die Genexpression der lokalen Komponenten des RAS war ausdifferenziertes Gewebe der physiologischen und pathophysiologischen Situation im adulten Tier ähnlicher.

Primärkulturen aus adulten Rattenherzen wurden meist nach vorausgehender Perfusion eines Langendorff-Herzens gewonnen. Um die Zellen möglichst frisch nach der Organentnahme und in möglichst nativem Zustand zu erhalten, sollte hier auf eine Perfusion des Gewebes verzichtet werden. Es mußte ein anderer Weg gefunden werden, um das Gewebe von Erythrozyten und anderen Blutbestandteilen zu befreien. Ein großer Teil der Erythrozyten konnte bereits durch eine Vorinkubation in collagenasehaltiger Lösung entfernt werden.

Zunächst aber war es das vorrangige Ziel, die Kardiomyozyten so schonend wie möglich aus dem Zellverband zu isolieren. Zur Beurteilung des Zustands der Zellen einerseits und des Isolationsgrades andererseits, wurden die mit Trypanblau angefärbte Zellsuspension unter dem Mikroskop begutachtet. Hatten die Zellen Trypanblau aufgenommen, waren sie zu stark beschädigt, waren aber die Zellklumpen vielschichtig und groß, und waren wenig oder keine einzelnen Herzmuskelzellen zu sehen, war die Isolation unzureichend

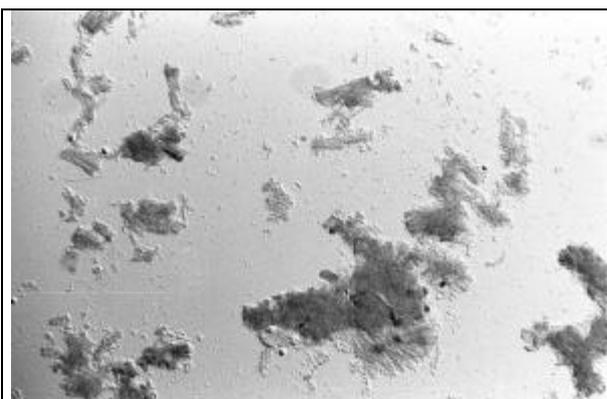
geblieben. Unter anderem war hierbei die Wahl der Collagenase entscheidend, es wurden verschiedene Collagenasen der Firma Sigma (Deisenhofen) getestet, bis sich eine Collagenase für die Isolation pankreatischer Inselzellen, die Clostridiopeptidase A vom Keim *Clostridium histolyticum* Typ V, als schonend und effektiv zugleich erwies. Eine Dosierung von 340 E/l wurde als optimale Enzymmenge ermittelt. Sie lieferte die größte Ausbeute an unbeschädigten, isoliert vorliegenden Kardiomyozyten und minimierte gleichzeitig die Anzahl nicht verwertbarer Gewebestückchen. Eine Ergänzung mit 100 mg/l DNase löste die Zellen sogar noch effektiver voneinander. Auch die einzelnen Inkubationsschritte wurden optimiert. Die ersten beiden 15-minütigen Inkubationen wurden zu einer 30-minütigen zusammengefaßt, nur unterbrochen durch das Auf- und Abpipettieren nach

15 Min., da so eine wesentlich höhere Ausbeute an einzeln vorliegenden Kardiomyozyten erzielt werden konnte als bei Ansätzen, bei denen die Collagenaselösung zwischendurch gewechselt wurde. Vor der letzten 15-minütigen Inkubation allerdings wurde die Collagenaselösung ausgewechselt, einerseits um eine zu starke Schädigung der bereits herausgelösten Herzmuskelzellen zu vermeiden, andererseits um durch die Zugabe frischer Collagenase den Isolationsprozeß wieder zu beschleunigen. Das Auf- und Abpipettieren durch eine 10 ml Pipette erleichterte durch die mechanischen Scherkräfte den Isolationsprozeß. Nach Abschluß der jeweiligen Inkubationen wurde die collagenasehaltige Lösung verdünnt und ausgewaschen, um eine weitere Schädigung des Gewebes zu verhindern.

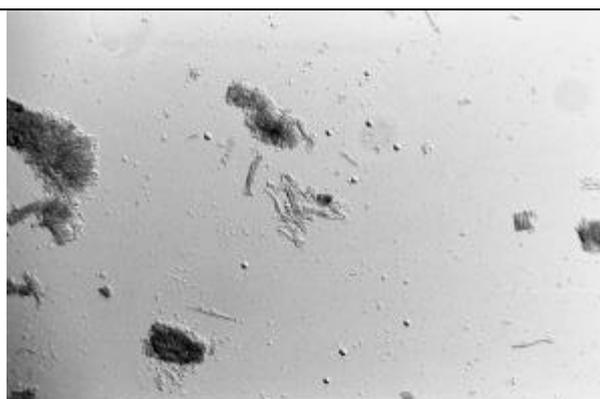
5.2.4 Percollgradient

Das so erhaltene Zellpellet enthielt neben Kardiomyozyten und flachen, lockeren Gewebeteilchen, die sich für Importversuche eigneten, auch dickere, vielschichtige Zellklumpen, die oftmals von der Collagenasebehandlung stark geschädigt waren, sowie Erythrozyten und andere Blutbestandteile (Abb.13. und Abb. 14). Um die geeigneten Zellen zu isolieren, wurde die Zellsuspension unter Ausnutzung von Dichteunterschieden über einen Percollgradienten aufgetrennt. Dabei lieferte ein 30%iger Gradient die beste Auftrennung, bei 37% Percoll trennten sich die Erythrozyten zwar sehr gut von den übrigen Zellen, aber diese trennten sich nur undeutlich in Fraktionen.

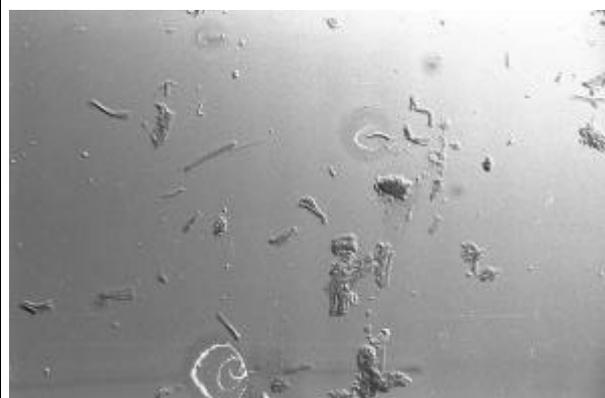
Der 30%ige Percollgradient dagegen lieferte 8 Kardiomyozytenfraktionen und eine Erythrozytenfraktion am Gefäßboden. Die Fraktionen 1 bis 5 enthielten die für die Aufnahmeversuche geeigneten Zellen. Fraktion 6 bis 8 enthielt neben größeren, stark collagenasegeschädigten Kardiomyozytenklumpen auch Nichtkardiomyozyten, wie beispielsweise Fibroblasten (Abb. 13 und Abb. 14). Durch mehrere Waschschriffe wurden die Percollreste aus der Zellsuspension entfernt. Vor dem Umstellen auf Inkubationsmedium wurde der Proteingehalt bestimmt, um einen Anhaltspunkt für vergleichbare Zellmengen bei verschiedenen Versuchen zu erhalten. Da sich viele der Kardiomyozyten noch im Zellverband befanden, wie in Gewebestückchen mit wenigen Zellagen, war es nicht möglich, exakte Zellzählungen vorzunehmen.



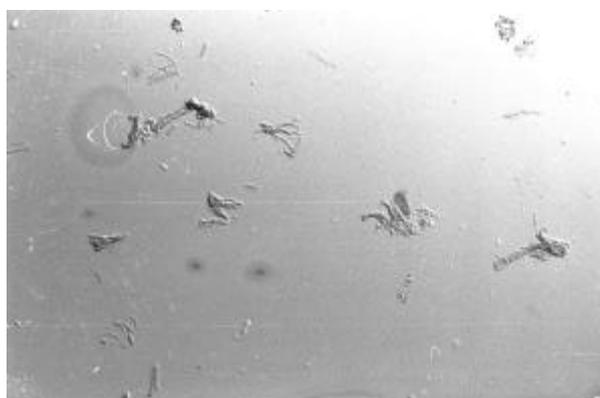
A: Zellsuspension vor Percoll



B: Zellsuspension vor Percoll



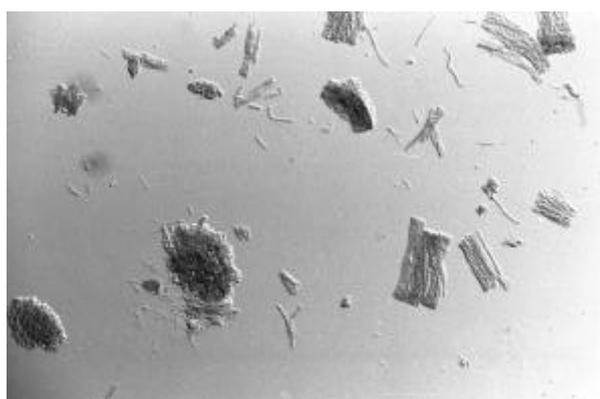
C: Fraktion 1



D: Fraktion 2



E: Fraktion 3



F: Fraktion 4

Abb. 13: Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 40 x) der isolierten Kardiomyozyten vor (A und B) und nach Fraktionierung über einen Percollgradienten, Fraktionen 1 bis 4 (C bis F).

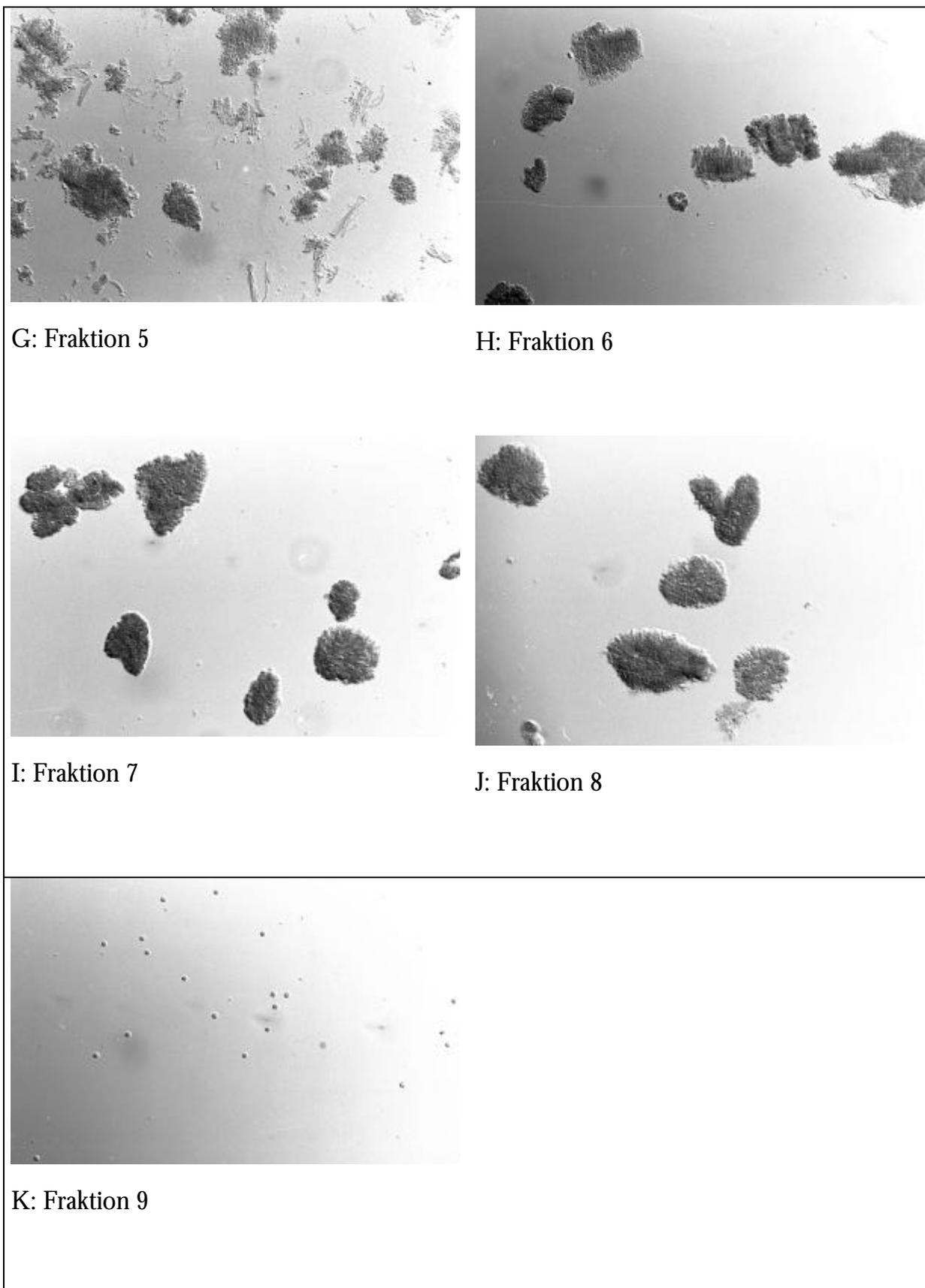


Abb. 14: Mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung: 40 x) der isolierten Kardiomyozyten nach Fraktionierung über einen Percollgradienten, Fraktionen 5 bis 9 (G bis K).

5.2.5 Aufnahmeexperimente

5.2.5.1 Importexperimente mit verschiedenen Reninkonstrukten aus Ratte und Maus

Für die Aufnahmeuntersuchungen wurde die Zellsuspension geviertelt und mit den entsprechenden radioaktiv markierten Proteinen versetzt. Zunächst wurde die Aufnahme von Prorenin und aktivem Renin untersucht, jeweils aus der Ratte oder vom Ren2-Gen der Maus stammend. Nach der 90-minütigen Inkubationszeit, in der die Zellen bei 37 °C unter Carbogenbegasung geschüttelt wurden, um eine gute Durchmischung mit den zu untersuchenden Proteinen zu erreichen, wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte blieb unbehandelt, während die andere auf Eis mit Proteinase K inkubiert wurde, um noch im Inkubationsmedium enthaltenes bzw. lediglich an der Zelloberfläche angelagertes Renin abzubauen. Die Inkubationszeit mit der Proteinase K war dabei von entscheidender Bedeutung, sie durfte weder zu kurz sein, so daß ein vollständiger Abbau aller nicht importierten Reninkonstrukte gewährleistet war, noch durfte sie zu lang sein und damit eine Schädigung der Zellen verursachen. Zur Kontrolle wurde deshalb jeweils auch der Überstand der Ansätze auf einem Acrylamidgel überprüft. Waren in den Überständen der mit Proteinase K behandelten Ansätze noch radioaktive Spuren des markierten Proteins, war der Abbau unvollständig geblieben. Waren allerdings die Zellproteine aus den mit Proteinase K behandelten Ansätzen auf dem mit Coomassie angefärbten Gel nicht mehr sichtbar, hatte die Proteinase auch die Zellen angegriffen. Die optimale Inkubationszeit mußte jedesmal erneut ermittelt werden, sobald eine neue Proteinase K-Lösung hergestellt worden war.

Neben den verschiedenen Ansätzen und Überständen wurden auch die *in vitro* translatierten Protein auf das Acrylamidgel aufgetragen. Diese Bande erlaubte einen Größenvergleich zwischen den jeweiligen Proteinen vor und nach der Aufnahme und zwischen den Proreninen und den dazugehörigen aktiven Reninen. Dieser Vergleich gab zusätzlich darüber Auskunft, ob nach der Aufnahme des Proteins eine weitere Prozeßierung erfolgte, d.h. ob möglicherweise eine Signalsequenz abgespalten wurde oder ob eine Aktivierung von Prorenin zu aktivem Renin stattgefunden hatte.

Bei der Auswertung der Röntgenfilme zeigte sich, daß beide Prorenine, sowohl das der Ratte als auch das Ren2-Prorenin der Maus von den Kardiomyozyten aufgenommen wurden, die beiden aktiven Renine jedoch nicht oder nur ein geringem Ausmaß. Beide Prorenine wurden nicht prozessiert, es fand auch keine Aktivierung zu aktivem Renin statt. Auch eine Degradation wurde nicht beobachtet (Abb. 15). Das Experiment wurde mehrmals mit den gleichen Ergebnissen durchgeführt (n=7). Abb. 15 zeigt ein repräsentatives Autoradiogramm. Um herauszufinden, ob auch nach längerer Inkubationszeit keine Aktivierung oder Degradation erfolgen würde, wurden die Ansätze über Nacht inkubiert.

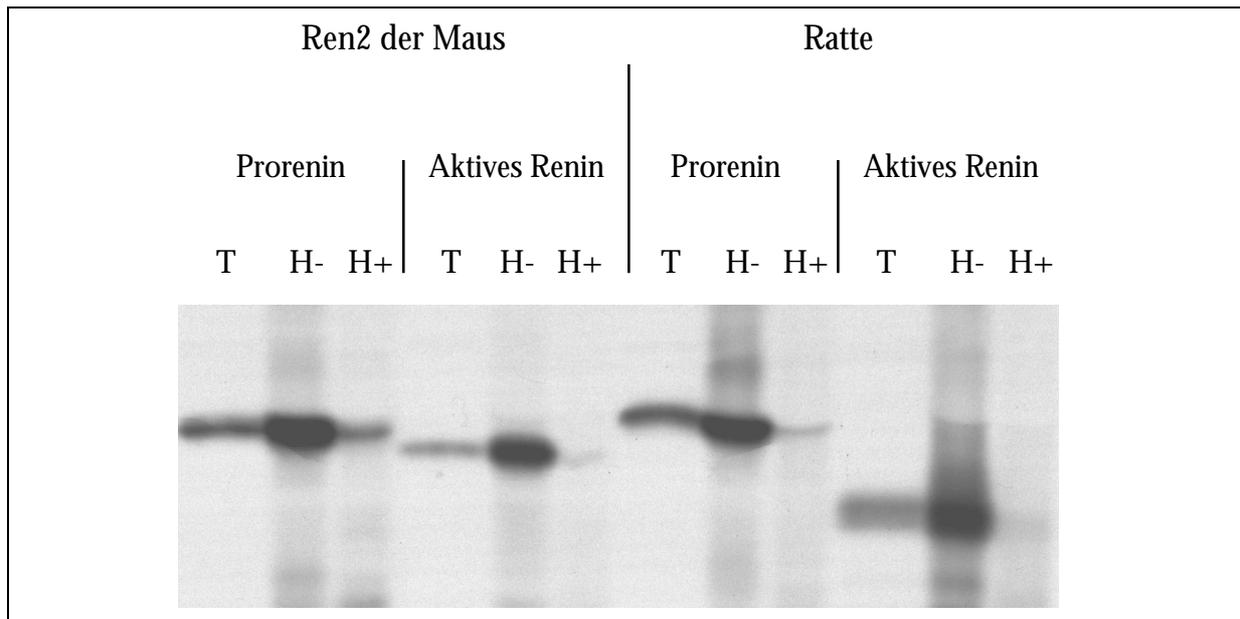


Abb. 15: Repräsentatives Autoradiogramm (n=7) eines in vitro Transports von Prorenin und aktivem Renin der Ratte und Maus in isolierte Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit in vitro translatiertem ^{35}S -markiertem Protein (Spur T) 90 Minuten lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spur H+), die andere blieb unbehandelt (Spur H-). Auf diese Weise wurde aufgenommenes Protein von membrangebundenem unterschieden.

5.2.5.2 Importexperimente über Nacht

In Übernachtenaufnahmeversuchen wurde nur das Prorenin der Ratte untersucht. Die entsprechende Menge an radioaktiv markiertem Protein wurde aus drei *in vitro* Translationsansätzen gewonnen. Die Kardiomyozytensuspension wurde wie zuvor geviertelt, wobei jeweils ein Viertel für andere Untersuchungen verwendet wurde. Die anderen drei Aliquots wurden mit Prorenin der Ratte versetzt und unterschiedlich lange inkubiert. Ein Ansatz diente als Kontrollansatz mit einer Inkubationszeit von 90 Minuten. Das zweite Aliquot wurde 16 Stunden lang inkubiert. Der dritte Ansatz wurde zunächst 90 Min. lang inkubiert, dann wurde der Überstand mit noch nicht aufgenommenem bzw. nicht an die Zellmembran angelagertem Renin entfernt. Die Kardiomyozyten wurden gewaschen und mit frischem Medium versetzt, das keine radioaktiv markierten Proteine mehr enthielt. Der Vergleich der Stärke der entstandenen Banden erlaubte Rückschlüsse auf die Vorgänge während der Inkubation. Wie erwartet war die Bande des aufgenommenen Prorenins nach 16 Stunden stärker als nach 90 Min., auch die Menge des an der Zellmembran anhaftenden Renins veränderte sich. Wurde der Überstand nach 90 Min. aber von nicht angelagertem Prorenin befreit, nahmen die Kardiomyozyten in den folgenden 14 Stunden an der Membran anhaftendes Protein auf, so daß die Bande des extrazellulär verbleibenden Prorenins schwächer wurde. Gleichzeitig nahm intrazellulär die Menge des aufgenommenen Prorenins um etwa den gleichen Teil zu, es schien kein Verlust durch Degradation aufzutreten. Die Menge des importierten Prorenins war größer als die im Kontrollansatz, wo die Möglichkeit zur Internalisierung von angelagertem Protein über 90 Min. hinaus fehlte, und kleiner als in den 16 Stunden-Importexperimenten, die angelagertes und dann aufgenommenes Prorenin jederzeit aus dem Überschuß im Medium ergänzen konnten. In keinem der Ansätze konnte eine Spaltung zu aktivem Renin beobachtet werden, das als *in vitro* Translationsprodukt zum Größenvergleich mit aufgetragen wurde (Abb. 16).

Man kann davon ausgehen, daß ein Teil der Kardiomyozyten durch die vorausgehende Isolation schon zu stark geschädigt war, um die lange Inkubationszeit des Übernachtexperimentes zu überstehen. Um das Ausmaß des Zelluntergangs während der Inkubation besser beurteilen zu können, wurden die Zellen vor und nach der Inkubation mit 5 mg/ml MTT versetzt. Dieser ursprünglich gelbe Farbstoff wird von intakten Zellen mitochondrial zu einem violetten Stoff oxidiert, dessen Extinktion im ELISA-Photometer gemessen werden kann. Die Auswertung ergab, daß immerhin 60-75% der Zellen am nächsten Morgen noch in der Lage waren, MTT umzusetzen.

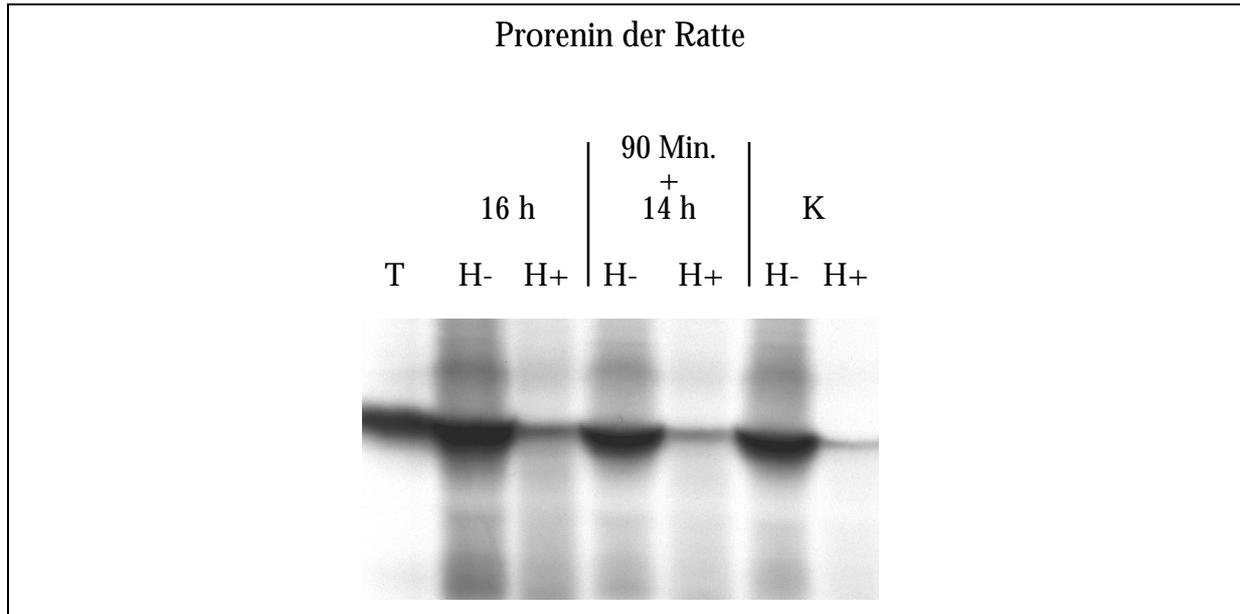


Abb. 16: Repräsentatives Autoradiogramm (n=3) eines in vitro Transports von Prorenin der Ratte in isolierte Kardiomyozyten mit Übernachtinkubation. Die Kardiomyozyten wurden mit in vitro translatiertem ^{35}S -markiertem Protein (Spur T) 16 Stunden lang inkubiert (16 h). Außerdem wurde eine Inkubation über 90 Min., der nach Auswaschen des markierten Proteins eine weitere 14-stündige Inkubation in erneuertem Medium folgte (90 Min. + 14 h), sowie eine Kontrollinkubation über 90 Min (K) durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spur H+), die andere blieb unbehandelt (Spur H-).

5.2.5.3 Importexperimente mit Protein D36

Abgesehen von den bereits erwähnten Reninkonstrukten wurde die Aufnahme einer weiteren Variante des Rattenrenins untersucht. Die für Protein D36 kodierende DNA, die durch Deletion aus der Basensequenz von Präprorenin hervorging, resultiert in einem verkürzten Prorenin, das erfolgreich in isolierte Mitochondrien importiert werden konnte. Protein D36 entspricht vermutlich dem Translationsprodukt der vor kurzem entdeckten Exon 1A-Renin-mRNA, dem das gesamte Präfragment und 10 Aminosäuren des Profragments fehlen (Claus-meyer *et al.*, 1999).

In den Experimenten wurde keine Internalisierung von Protein D36 beobachtet (Abb. 17). Dies könnte bedeuten, daß das Signal für eine Aufnahme in Kardiomyozyten im vorderen Teil des Profragments zu finden ist.

5.2.5.4 Importexperimente mit den Peptiden 789 und 790

Da bei den Aufnahmeversuchen mit Rattenprorenin und D36-Renin das Fehlen von 10 N-terminalen Aminosäuren über Erfolg oder Mißerfolg zu entscheiden schien, wurde versucht, die Proreninaufnahme durch die Zugabe von Peptiden zu hemmen, die diese 10 Aminosäuren enthielten. Die Peptide sollten die entsprechenden Bindungsstellen des vermuteten Transportsystems besetzen und so eine Anlagerung der Prorenine erschweren. Verwendet wurden jeweils Peptide mit den Anfangssequenzen von Rattenprorenin und dem Ren2-Prorenin der Maus. Das vom Rattenrenin abgeleitete Peptid 789 hatte die Aminosäuresequenz LPTDTASFGRILLKK, das vom Ren2-Renin der Maus abgeleitete Peptid 790 die Sequenz LPTGTTFERIPLKK. In beiden Fällen konnte kein Effekt auf die Aufnahme der beiden Prorenine nachgewiesen werden (Abb. 18). Die zuvor aufgestellte Hypothese konnte damit nicht bestätigt werden. Möglicherweise fehlte den Peptiden aber auch lediglich die korrekte Konformation für eine Hemmung der Aufnahme.

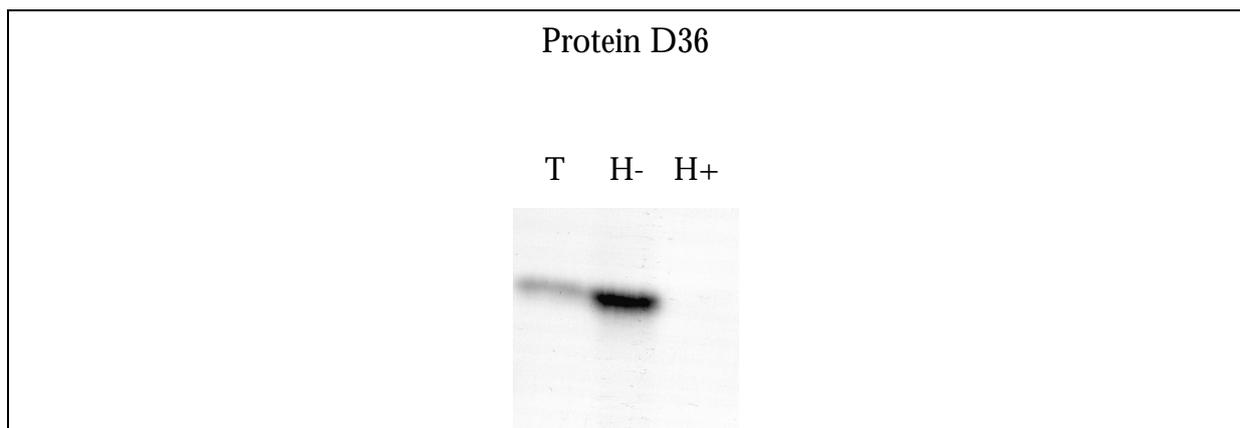


Abb. 17: Repräsentatives Autoradiogramm (n=2) eines in vitro Transports von Protein D36 in isolierte Kardiomyozyten. Die Kardiomyozyten wurden mit in vitro translatiertem ^{35}S -markiertem Protein (Spur T) 90 Minuten lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spur H+), die andere blieb unbehandelt (Spur H-).

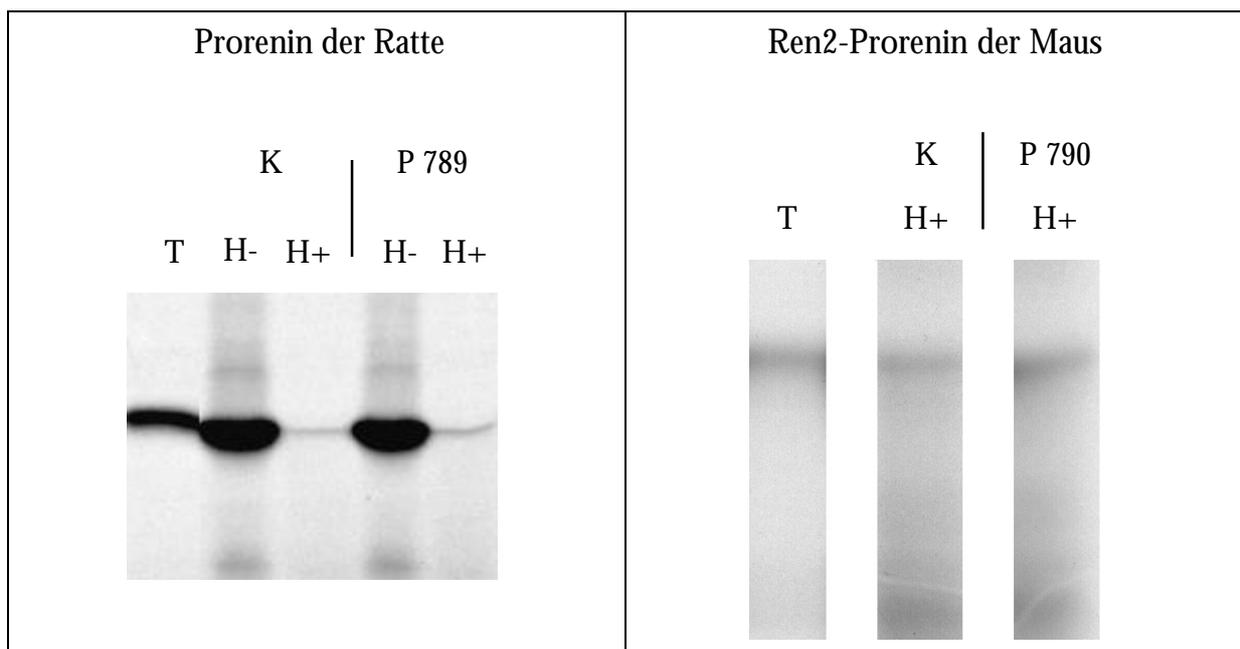


Abb. 18: Repräsentatives Autoradiogramm (n=3) eines in vitro Transports von Prorenin der Ratte und Maus in isolierte Kardiomyozyten in der Gegenwart von Peptid 789 und Peptid 790, die jeweils den N-terminalen Teil der Profragments beider Prorenine enthalten. Die Kardiomyozyten wurden mit in vitro translatiertem ^{35}S -markiertem Protein (Spur T) und dem entsprechenden Peptid 90 Min. lang inkubiert. Als Kontrollinkubation diente eine Inkubation mit markiertem Protein über 90 Min. (K). Nach der Inkubation wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spur H+), die andere blieb unbehandelt (Spur H-).

5.2.5.5 Importexperimente mit unmarkiertem aktivem Renin der Ratte (R2)

Im Verlauf der Importversuche lagerte sich stets ein großer Teil der radioaktiv markierten Proteine an der Zelloberfläche an. Dabei schien es keinen Unterschied zu machen, ob diese Renine später auch aufgenommen wurden. Aktives Renin lagerte sich im gleichen Maß an wie Prorenin. Um den Einfluß dieser Membranbindung auf eine Aufnahme genauer zu charakterisieren, wurde aktives Renin der Ratte (R2), das aus Rattennieren aufgereinigt worden war, im Überschuß neben ³⁵S-markiertem Rattenprorenin zu den Ansätzen gegeben. Das Signal des importierten Prorenins war in den Ansätzen mit R2 lediglich andeutungsweise schwächer als in den Kontrollansätzen ohne R2. Die Untersuchung der Membranbindung selbst ergab keine Verringerung des angelagerten Prorenins durch R2. Auch in einem Experiment mit aktivem Renin der Ratte, bei dem die Anlagerung des radioaktiven Renins mit und ohne R2-Zugabe verglichen wurde, zeigte sich kein Unterschied (Abb. 19). Die Konkurrenz von R2 mit den radioaktiv markierten Reninen scheint demnach nur schwach ausgeprägt zu sein und auch die Aufnahme von Prorenin nur in geringem Ausmaß zu beeinträchtigen.

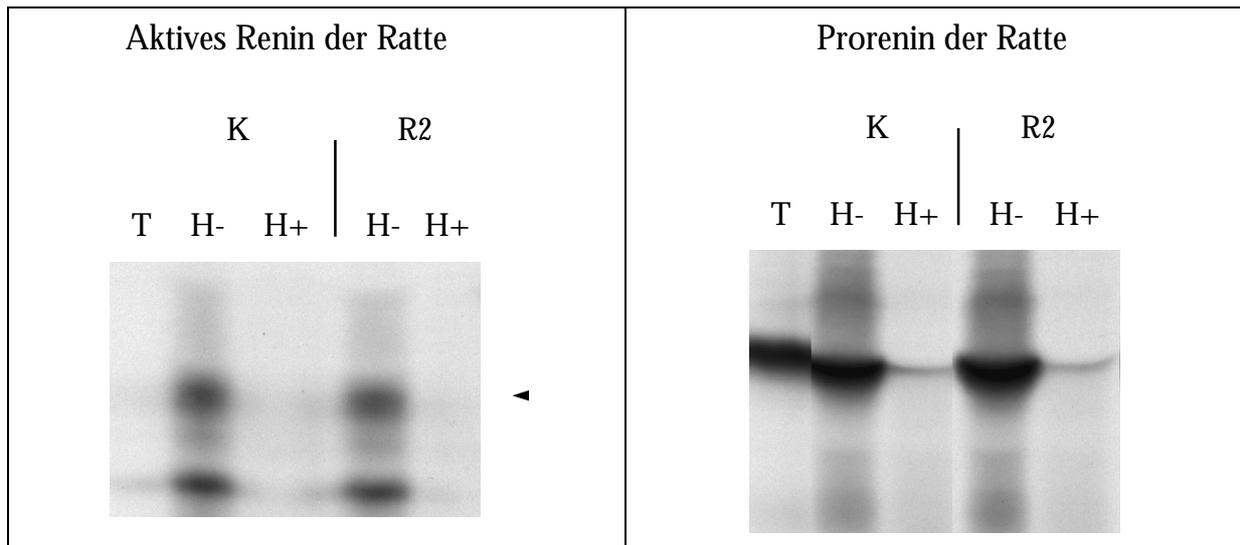


Abb. 19: Repräsentatives Autoradiogramm ($n=2$) eines *in vitro* Transports von Prorenin und aktivem Renin der Ratte in isolierte Kardiomyozyten in der Gegenwart von unmarkiertem aktivem Renin (R2). Die Kardiomyozyten wurden mit *in vitro* translatiertem ^{35}S -markiertem Protein (Spur T) sowie unmarkiertem Protein 90 Minuten lang inkubiert. Als Kontrollinkubation diente eine Inkubation mit markiertem Protein über 90 Min. (K). Nach der Inkubation wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spur H+), die andere blieb unbehandelt (Spur H-).

5.2.5.6 Importexperimente mit Mannose-6-phosphat

Verschiedene Arbeitsgruppen bringen die Effekte von zirkulierendem Renin mit dem Mannose-6-phosphat-Rezeptor in Verbindung. Dabei bindet der Oligosaccharidrest, der während der Prozessierung im Golgi-Apparat an Renin angeheftet wird, an Mannose-6-phosphat-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Erst durch diese Anheftung soll eine Aufnahme ermöglicht werden. Da in vitro translatierte Renine in nicht glykosylierter Form vorliegen, scheint Prorenin in unseren Experimenten durch einen anderen Mechanismus in die Zellen aufgenommen zu werden. Um dennoch einen eventuellen Einfluß von Mannose-6-phosphat auf die Aufnahme von Rattenprorenin auszuschließen, wurde den Ansätzen neben Prorenin Mannose-6-phosphat zugesetzt und der Effekt beobachtet. Dazu wurde neben zwei Kontrollansätzen mit Prorenin, deren Inkubationszeiten bei 90 Min. und 3 Stunden lagen, ein Ansatz mit Prorenin und Mannose-6-phosphat über 90 Min. inkubiert. Außerdem wurde untersucht, ob ein Zusatz von Mannose-6-phosphat eine Ausschüttung von zuvor während einer 90 Min.-Inkubation aufgenommenem Renin bewirken konnte, indem weitere 90 Min. mit Mannose-6-phosphat inkubiert wurde. Eine solche Ausschüttung von gespeichertem Renin konnte bei Versuchen mit der isolierten Niere beobachtet werden (S. Clausmeyer, unveröffentlichte Daten). Die Versuchsauswertung allerdings zeigte, daß eine Zugabe von Mannose-6-phosphat zu keinem Zeitpunkt einen Einfluß auf die Proreninaufnahme zu haben schien (Abb. 20).

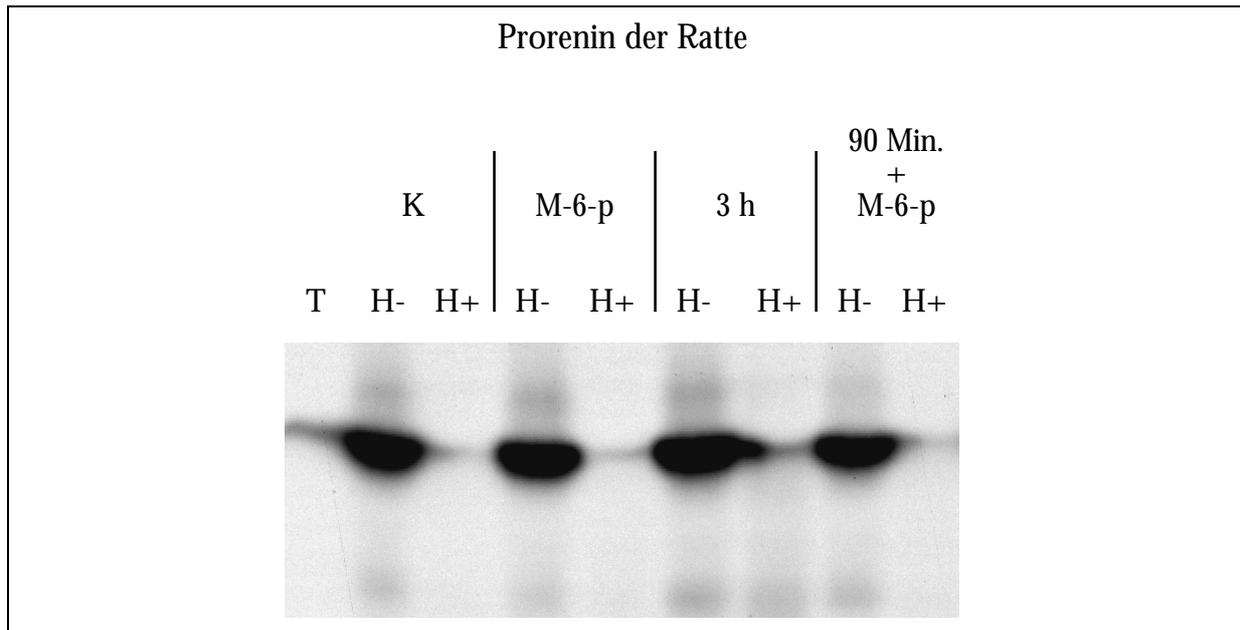


Abb. 20: Repräsentatives Autoradiogramm (n=2) eines in vitro Transports von Prorenin der Ratte in isolierte Kardiomyozyten in der Gegenwart von Mannose-6-phosphat. Die Kardiomyozyten wurden mit in vitro translatiertem ^{35}S -markiertem Protein (Spur T) sowie Mannose-6-phosphat 90 Minuten lang inkubiert (M-6-p). Außerdem wurde nach einer Vorinkubation der Kardiomyozyten mit markiertem Protein nach 90 Min. Mannose-6-phosphat zugegeben und weitere 90 Min lang inkubiert (90 Min + M-6-p). Als Kontrollinkubationen dienten Inkubationen mit markiertem Protein über 90 Min. (K) und drei Stunden (3 h). Nach der Inkubation wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spur H+), die andere blieb unbehandelt (Spur H-).

5.2.5.7 Importexperimente mit Concanavalin A und Ammoniumchlorid

Um den Aufnahmemechanismus genauer zu charakterisieren, wurde versucht, die Aufnahme von Prorenin in die Kardiomyozyten durch verschiedene Inhibitoren bestimmter Aufnahmemechanismen zu hemmen. Dabei wurde einerseits Concanavalin A verwendet, das von anderen Gruppen u.a. mit dem Ziel eingesetzt wurde, eine Umlagerung von Rezeptoren von der Zelloberfläche in intrazelluläre Vesikel und ihr Recycling zu unterbinden (Waldo *et al.*, 1983; Lohse *et al.*, 1990; Pippig *et al.*, 1995). Andererseits wurde den Inkubaten Ammoniumchlorid zugesetzt, das die normale Funktion des endosomalen Systems beeinträchtigt und auf diese Weise ebenfalls das Recycling von Rezeptoren auf der Zelloberfläche stört (Review: Wileman *et al.*, 1985). Als Kontrollansatz diente wieder ein 90 Min.-Aufnahmeversuch mit Rattenprorenin, die beiden Testansätze enthielten neben der gleichen Proreninmenge Concanavalin A und Ammoniumchlorid, wobei Concanavalin A bereits während einer Vorinkubation von 30 Min. zugesetzt wurde, um eine Absättigung der Zellmembran zu erreichen. Während die Zugabe von Ammoniumchlorid die Proreninaufnahme verringern konnte, war der Effekt, den der Zusatz von Concanavalin A auslöste, schwächer ausgeprägt (Abb. 21). Der Aufnahmemechanismus scheint demnach den Vorgängen zu ähneln, die beim Recycling von Rezeptoren ablaufen, die sich auf der Zelloberfläche befinden.

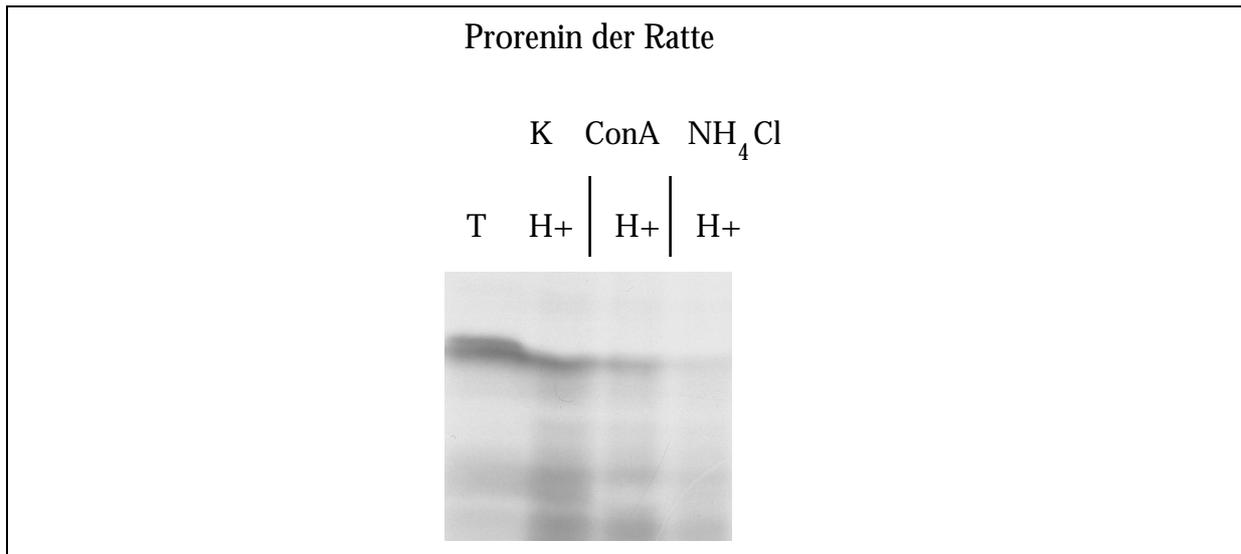


Abb. 21: Repräsentatives Autoradiogramm eines *in vitro* Transports von Prorenin der Ratte in isolierte Kardiomyozyten in der Gegenwart von Concanavalin A (Con A) (n=3) und Ammoniumchlorid (NH₄CL). Die Kardiomyozyten wurden mit *in vitro* translatiertem ³⁵S-markiertem Protein (Spur T) und der jeweiligen Substanz 90 Minuten lang inkubiert. Als Kontrollinkubation diente eine Inkubation mit markiertem Protein über 90 Min. (K). Nach der Inkubation wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde mit Proteinase K behandelt (Spur H+), die andere blieb unbehandelt (Spur H-, nicht gezeigt).

5.3 Herstellung rekombinanter Renine in Zellkultur

5.3.1 Konstruktion der einzelnen Reninplasmide für die Transfektion

Das Einführen unterschiedlicher Reninkonstrukte in die Leberzelllinie HepG2 hatte verschiedene Gründe. Zum einen sollten größere Mengen glykosyliertes Rattenprorenin gewonnen werden. Dabei wurde die Vermutung ausgenutzt, daß HepG2-Zellen in Gegensatz zu anderen Zellen angeblich nicht in der Lage sind, Prorenin zu aktivieren. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Theorie. Das so erhaltene Prorenin soll in Experimenten mit isolierten Kardiomyozyten eingesetzt werden, um die Aufnahme mit der von in vitro translatiertem und deshalb nicht glykosyliertem Rattenprorenin zu vergleichen. Die Überexpression von aktivem Renin der Ratte ohne Präfragment dagegen diente entsprechend der Gewinnung von nicht glykosyliertem aktivem Renin. Von M. Sharp wurden zusätzlich HepG2-Zellen zur Verfügung gestellt, die nicht glykosyliertes Ren2-Präprorenin überexprimieren. Die Aufnahmeexperimente sollen außerdem gegebenenfalls funktionelle Aussagen (beispielsweise zur Angiotensinbildung) liefern. Zum anderen sollte der intrazelluläre Transport von Exon 1A-Renin verfolgt werden, um die Vermutung einer zytosolischen bzw. mitochondrialen Lokalisation zu unterstützen. In den HepG2-Zellen sollten also Präprorenin, aktives Renin, Exon 1A-Renin und Protein D36, eine Deletionsvariante des Präprorenins, überexprimiert werden. Dazu wurden die Inserts der entsprechenden Plasmide aus den Bluescript-Vektoren ausgeschnitten und in den pcDNA3-Vektor ligiert, die die Expression in der Zielzelle, und aufgrund einer im Vektor enthaltenen Resistenz, eine Selektion durch den Zusatz von Geneticin zum Medium ermöglicht. Exon 1A-Renin allerdings war noch nicht in seiner gesamten Länge kloniert worden.

Darum mußte zunächst das PCR-Fragment, das nach einer 5'-Race-Reaktion in einen Bluescript-Vektor kloniert worden war (Clausmeyer *et al.*, 1999), im 3'-Bereich vervollständigt werden, der durch die RT-PCR mit „nested“ Primern etwas verkürzt war. Da sich Exon 1A-Renin und Präprorenin lediglich am 5'-Ende unterscheiden, konnte dafür der Rattenpräprorenin-Klon Ren/BSC verwendet werden. Das G1/Kpn I-Plasmid, das ein Kpn I-geschnittenes Fragment des 5'-RACE-G1-Inserts enthielt, wurde zunächst mit der Restriktionsendonuklease Sma I geschnitten, wobei ein Teil der Adaptorsequenz des 5'-RACE erhalten blieb. Das Restplasmid wurde mit dem Enzym Kpn I geschnitten, und

das abgetrennte 270 Bp-Fragment über ein Agarosegel isoliert (Abb. 22). Für den zweiten Teil des Exon 1A-Plasmids, das zunächst immer noch im Bluescript-Vektor kloniert sein sollte, wurde der Präprorenin-Klon Ren/BSC ebenfalls mit Kpn I geschnitten. Nach einer Ethanol-fällung, da beide Enzyme unterschiedliche Puffer benötigen, folgte eine Restriktion mit Hind III. Die Fragmente mit einer Länge von 480 und 700 Bp wurden über ein Agarosegel aus dem Ansatz isoliert. Der Bluescript-Vektor, in den die Fragmente kloniert werden sollten, wurde in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen mit den Restriktionsenzymen Sma I und Hind III geschnitten.

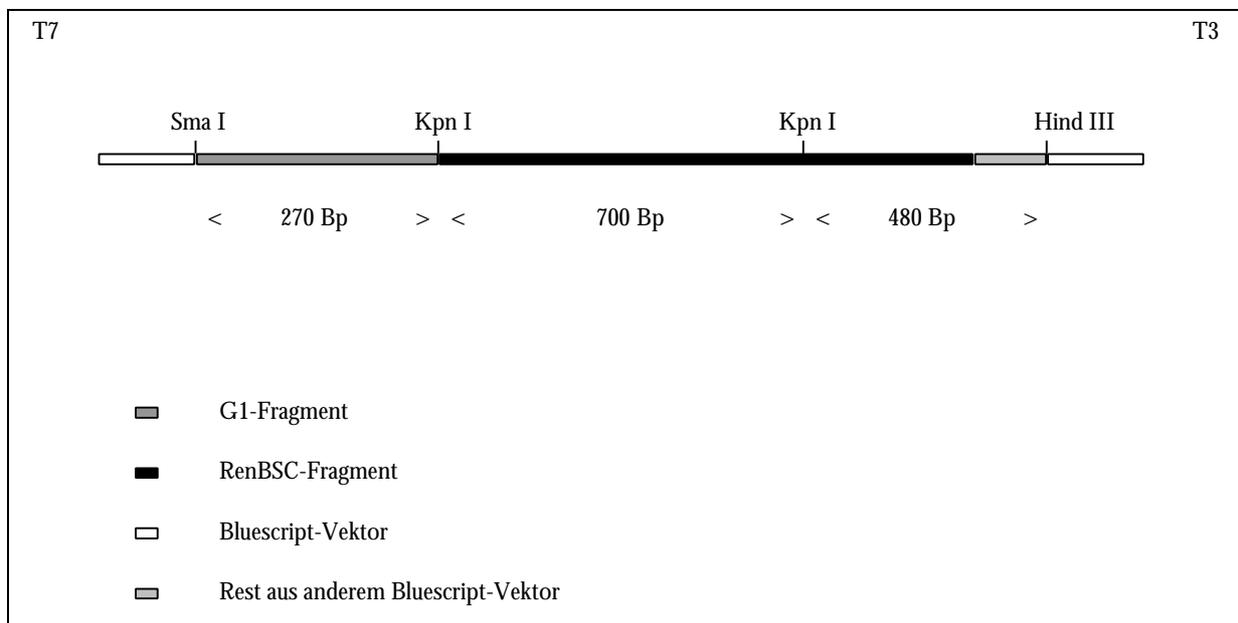


Abb. 22: Zusammensetzung des G1/K1-Plasmids, das auf das Exon 1A-Transkript zurückgeht. Der 5'-RACE-Klon wurde am 3'-Ende durch Präprorenin der Ratte (RenBSC) vervollständigt.

Die Ligation aller Fragmente wurde in zwei Stufen durchgeführt. Zunächst wurden die beiden 480 und 700 Bp großen Fragmente aus dem Ren/BSC-Klon miteinander ligiert. Auf diese Weise sollte eine Ligation zwischen den Kpn I-Enden des 480 Bp-Fragments und dem 270 Bp-Fragment aus dem G1/Kpn I -Klon verhindert werden. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden auch das aus dem G1/Kpn I Klon stammende Fragment und der Sma I/Hind III-geschnittene Vektor zugegeben. Nach einer Transformation in E.coli-Zellen wurden die resultierenden G1/K1-Klone durch Testschnitte mit

Kpn I (Restplasmid + 700 Bp), EcoR I (Restplasmid + 250 Bp) und der Kombination BamH I /Hind III überprüft (Restplasmid + 1400 Bp). Hierbei mußte besonders auf die Orientierung des 700 Bp-Fragments geachtet werden, das wegen seiner beiden Kpn I-geschnittenen Enden in beiden Richtungen ligiert werden konnte. Entstand beim EcoR I-Schnitt ein 250 Bp-Fragment, war die Orientierung korrekt.

Für die Umklonierung der Exon 1A-Renin-Sequenz in den pcDNA3-Vektor wurde das Renin-Plasmid und der Vektor in zwei aufeinanderfolgenden Inkubationen jeweils mit den Restriktionsenzymen BamH I und Xho I geschnitten. Insert und pcDNA3-Vektor wurden über ein Agarosegel isoliert, über Nacht ligiert und transformiert. Die resultierenden Ren G2-Klone wurden durch Testschnitte mit Hind III (Restplasmid + 1450 Bp), Kpn I (Restplasmid + 300 Bp + 700 Bp) und EcoR I (Restplasmid + 250 Bp + 1000 Bp) überprüft. Die korrekte Basensequenz wurde durch Sequenzierung bestätigt. Für die Transfektion wurde der Klon Ren G2/12 verwendet.

Der Protein D36-Klon 1.3 wurde mit der Enzymkombination BamH I/Hind III in den pcDNA3-Vektor ligiert und anschließend transformiert. Als Testrestriktionen diente in diesem Fall ein Doppelansatz mit den zur Umklonierung verwendeten Enzymen, die das gesamte Insert, das eine Länge von ca. 1450 Bp aufwies, wieder ausschneiden sollten. Auch hier wurde die korrekte Basenabfolge durch Sequenzierung überprüft. Der Klon D36/9 wurde weiterverwendet.

Für die Umklonierung von Präprorenin und aktivem Renin der Ratte in den Transfektionsvektor wurden die Plasmide Ren/BSC und Ren 10.7 verwendet. Ren/BSC wurde über die Schnittstellen von BamH I und Xho I in den pcDNA3-Vektor ligiert, Ren 10.7 über die Schnittstellen von BamH I und Hind III. Anschließend wurde transformiert. Die korrekte Insertgröße wurde wiederum durch Testrestriktionen mit den zur Klonierung verwendeten Enzymen überprüft. Die Klone PP 16 und act. Ren 11 wurden für die Transfektion verwendet. Eine Sequenzierung wurde für die beiden letzten Renine nicht vorgenommen, da es sich lediglich um die Umklonierung eines bereits sequenzierten Inserts in einen anderen Vektor handelte.

5.3.2 Transfektion

Die Reninkonstrukte wurden in Zellen der Leberzelllinie HepG2 eingeführt. Für die Transfektion wurde das FuGENE-System verwendet, das neben einer höheren Transfektionsrate eine einfachere und schnellere Handhabung als andere Methoden, wie beispielsweise die Calciumphosphat-Methode, sowie eine hohe Reproduzierbarkeit und relativ geringe Toxizität für die Zellen bietet (Kurachi *et al.*, 1998). Am Tag nach der Transfektion wurde erstmals Geneticin in einer Konzentration von 400 µg/ml zugegeben. In den folgenden beiden Tagen starben die nicht transfizierten Zellen nur sehr langsam ab, weswegen die Geneticinmenge auf 800 µg/ml erhöht wurde. Nach weiteren 5 Tagen war ein großer Teil der ursprünglich für die Transfektion eingesetzten Zellen abgestorben, die Geneticinmenge wurde auf 200 µg/ml reduziert, da auch die verbliebenen Zellen von der hohen Geneticinmenge geschädigt schienen. Leider schien die Transfektionsrate mit schätzungsweise 3% nicht ganz so hoch zu sein, wie die Experimente von Kurachi hoffen ließen, der den menschlichen Koagulationsfaktor mit einer Transfektionsrate von über 20% in HepG2-Zellen einbrachte (Kurachi *et al.*, 1998). Für die spätere Vermehrung erwies sich eine Geneticinkonzentration von 400 µg/ml als optimal, wie S. Clausmeyer in einer Konzentrationsreihe von 200 bis 1000 µg/ml ermittelte. Bei geringeren Konzentrationen begannen auch nicht transfizierte Zellen wieder zu wachsen und senkten so die Gesamtausbeute an Renin.

Die Überexpression der einzelnen Reninkonstrukte war in allen vier Fällen erfolgreich und führte zu meßbarer Reninaktivität in den Zellen, und im Fall von Präprorenin auch im Medium. Dieser Befund entspricht den Erwartungen, da lediglich das Vorhandensein eines Präfragments eine Sekretion von Renin ermöglichen sollte. Auf seinem Weg durch die Vesikel des Golgi-Apparates wird sekretorisches Renin verändert, neben einer Verkürzung zu Prorenin oder aktivem Renin findet eine Glykosylierung statt. So lieferte die Überexpression von Präprorenin in HepG2-Zellen große Mengen glykosylierten Prorenins, das unreguliert und ohne gespeichert zu werden die Zelle verläßt, und so für weitere Experimente verwendet werden kann. Die Überexpression von aktivem Renin der Ratte und eine entsprechende Aufreinigung aus den Zellextrakten der HepG2-Zellen dagegen diente der Gewinnung von nicht glykosyliertem aktivem Renin. Die restlichen in HepG2-Zellen eingebrachten Reninkonstrukte ermöglichen weitere Experimente zur

Lokalisation intrazellulärer Renine und sollen Informationen über den intrazellulären Transport von Exon 1A-Renin liefern.

Alle Konstrukte wurden erfolgreich transfiziert und ihre korrekte Expression kontrolliert. Sie befinden sich jetzt in weiteren Versuchen im Einsatz.

6 Diskussion

6.1 Risikofaktor Herzhypertrophie

Das Verständnis des RAS hat sich in den letzten Jahrzehnten gewandelt. Die klassische Sichtweise von Ang II als Vasokonstriktor, der hauptsächlich an Gefäßen seine Wirkung entfaltet und zudem den Salz- und Wasserhaushalt reguliert, wurde schrittweise erweitert. Neben seinen kardialen Effekten wie Kontraktilitätssteigerung und Regulation des koronaren Blutflusses interagiert das RAS mit dem sympathischen System. Außerdem hat man ein zellwachstumsförderndes Potential entdeckt. In Zellkultur konnte gezeigt werden, daß Ang II eine Hypertrophie in Kardiomyozyten hervorruft (Review: Yamazaki *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang könnte eine z.B. durch gesteigerte lokale RAS-Aktivität erhöhte Ang II-Konzentration im Herzgewebe die Entwicklung einer Hypertrophie unterstützen.

Auf zellulärer Ebene führt eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen zu einer ungünstigen Energiebilanz in der Zelle. Der erhöhte Nährstoffbedarf kann nicht mehr mit dem Angebot aus dem kapillaren Blut gedeckt werden, zumal das Lumen der zuleitenden Gefäße durch die Expansion der Kardiomyozyten abnimmt. Zusätzlich verschärft wird die Situation durch die Zunahme an Sarkomeren, die mit der Hypertrophie einhergeht. So treten zwangsläufig Unterversorgungen auf, die schließlich zum Untergang von Herzmuskelzellen führen können (Review: Ikram, 1996). Katz nannte diesen Vorgang „cardiomyopathy of overload“ (Katz, 1990).

Dafür, daß neben Dehnungsreizen, die bei erhöhter Druck- und Volumenbelastung auftreten, auch Ang II eine Rolle in der Entwicklung der Herzhypertrophie spielen kann, spricht auch die Ähnlichkeit der jeweils induzierten intrazellulären Signaltransduktion. Diese Signale werden im allgemeinen durch Phosphorylierungsreaktionen einer Proteinkinasekaskade in den Zellkern übertragen. Sowohl eine mechanische Dehnung als auch Ang II aktivieren u. a. die Proteinkinase C, die ihrerseits die Aktivität der MAP-Kinasen erhöht. MAP-Kinasen sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die durch eine Vielzahl von Substanzen aktiviert werden können, wie z. B. durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Insulin. Aktivierte MAP-Kinasen wandern in den Zellkern und führen zu einer ver-

stärkten Genexpression und Proteinsynthese in Kardiomyozyten (Review: Yamazaki *et al.*, 1996). Es wurde gezeigt, daß mechanische Dehnung in Rattenherzen über aktivierte MAP-Kinasen die Expression von Genen induziert, die normalerweise in der frühen Entwicklung der Tiere aktiviert sind und für Transkriptionsfaktoren kodieren, wie z.B. *c-myc* und *c-fos* (Review: Yamazaki *et al.*, 1996). Diese unmittelbare Reaktion auf die Dehnung des Herzgewebes könnte der erste Schritt in der Hypertrophieentwicklung sein, der durch Ang II-vermittelte Signale zusätzlich beschleunigt werden könnte.

Das zellwachstumsfördernde Potential von Ang II könnte auch das Geschehen nach einem Myokardinfarkt beeinflussen. Die auftretenden strukturellen Veränderungen, das sog. „Remodeling“, werden zumindest zum Teil über die Induktion von Proto-Onkogenen wie *c-fos*, *c-myc* und *c-jun* vermittelt (Review: Ikram 1996). Unter dem Begriff „Remodeling“ versteht man eine adaptive Veränderung des Gewebes im Hinblick auf die Postinfarktsituation. Diese dient dazu, die Herzfunktion zu erhalten, indem sie dem Ventrikel erlaubt, ein größeres Volumen zu fassen. Dabei konnte beobachtet werden, daß die Myozyten begannen, sich Seite an Seite anzuordnen (Olivetti *et al.*, 1990). Unter bestimmten Voraussetzungen, beispielsweise bei einem ausgedehnten Infarktgebiet, schreitet dieser Prozeß weiter fort, und mit ihm die Dilatation der Herzkammer und ihre Hypertrophie, um schließlich eine Herzinsuffizienz auszulösen (Review: Ikram 1996).

Der Versuch, pathologische Vorgänge durch den Einsatz von RAS-Inhibitoren zu unterdrücken, war erfolgreich. Sowohl ACE-Hemmer als auch AT₁-Rezeptorantagonisten zeigten vorteilhafte Einflüsse auf die Entwicklung der Herzhypertrophie. Die Tatsache, daß diese Effekte nicht nur durch eine Blutdrucksenkung zu erklären waren, unterstreicht die Bedeutung des RAS in diesem Zusammenhang. In einem Experiment von Böhm *et al.* verringerte der AT₁-Rezeptorantagonist Telmisartan die Herzhypertrophie in hypertensiven Ren2-transgenen Ratten sogar in Dosierungen, die den Blutdruck nicht veränderten (Böhm *et al.*, 1995). Andere antihypertensive Substanzen hingegen waren im Gegensatz zu ACE-Hemmern und AT₁-Rezeptorantagonisten trotz ähnlicher Blutdrucksenkung nicht in der Lage, die Herzhypertrophie in den transgenen Tieren zu vermindern (Lee *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 1996). In der Postinfarkttherapie vermindern ACE-Hemmer im Gegensatz zu anderen antihypertensiven Substanzen das Ausmaß der „Remodeling“-Vorgänge oder sind sogar in der Lage, die strukturellen Veränderungen von Anfang an zu unterbinden (Review: Bader *et al.*, 1994).

6.2 Lokales RAS im Herz

Der Begriff eines ausschließlich systemischen RAS mußte überdacht werden, da zunehmend lokale Systeme u.a. für die Niere, die Nebenniere, das Gehirn, das Herz und die Gefäße beschrieben wurden (Review: Bader *et al.*, 1994). Die Situation im Herz, das zugleich ein wichtiges Zielorgan des zirkulierenden RAS ist, wurde mit großer Aufmerksamkeit untersucht, da man sich von einer spezifischen Modulation der RAS-Regulation im Herz neue Therapieansätze erhofft. Voraussetzung für eine solche Regulation ist natürlich die Existenz des RAS-Effektorpeptids Ang II im Herzgewebe, wie sie u.a. in Experimenten von Danser *et al.* nachgewiesen wurde (Review: Danser und Schalekamp, 1996). Die Arbeitsgruppe bestimmte Ang I- und Ang II-Mengen im Rattenherzgewebe und verglich sie mit den entsprechenden Plasmawerten. Während die kardiale Konzentration für Ang I sich nicht von der im Plasma unterschied, war die Ang II-Menge sogar zwei- bis dreimal höher als die Plasmakonzentration, was eine Kontamination aus der Zirkulation ausschließt. Unklar blieb hier allerdings, ob die kardialen Angiotensine aus einer *in situ* Synthese stammten oder aus der Zirkulation aufgenommen wurden (Review: Danser und Schalekamp, 1996).

Die These einer lokalen Produktion von Ang II im Herz wird außerdem von Untersuchungen am isolierten perfundierten Herz unterstützt, bei denen man eine Konversion von Ang I zu Ang II und damit eine ACE- bzw. ACE-ähnliche Aktivität feststellte (Needleman *et al.*, 1975).

Auch weitere Experimente am isolierten, perfundierten Herz konnten Ang I- und Ang II-Bildung nachweisen, allerdings erst nach der Zugabe von Renin zum Perfusionspuffer (Lindpaintner *et al.*, 1990). Das bedeutet, daß zwar Angiotensinogen und ACE im isolierten Herz präsent sind, nicht notwendigerweise aber auch Renin. Das ist ein Aspekt, der im weiteren Verlauf dieser Diskussion von Bedeutung sein wird.

Ein sehr interessantes Experiment von Sadoshima *et al.* zeigte, daß Ang II in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten gebildet und nach einer Dehnung der Zellen, die eine erhöhte Druck- bzw. Volumenbelastung des Herzgewebes simulieren soll, auch freigesetzt wird. Außerdem konnte beobachtet werden, daß dieses *in vitro* sezernierte Ang II in der Lage war, eine Hypertrophie in den verwendeten Kardiomyozyten hervorzurufen. Daß es

in diesem Fall nicht lediglich die mechanische Dehnung war, die die Hypertrophie in den Zellen auslöste, wurde durch die Wirkung des Ang II-haltigen Mediums auf nicht gedehnte Kardiomyozyten nachgewiesen, die auch in diesem Fall eine Hypertrophie entwickelten (Sadoshima *et al.*, 1993). Die beobachtete Signalweiterleitung in die Zelle unterstützt die Theorie einer lokalen Wirkung von Ang II und damit die Existenz eines lokalen Systems im Herz.

6.3 Definition eines lokalen Systems

Wie die vorangehenden Abschnitte zeigen, kann an der Existenz intrakardialer RAS-Aktivität, die aus lokaler Ang II-Bildung hervorgeht, nicht mehr gezweifelt werden. Aber ist damit auch automatisch der Beweis für ein lokales Renin-Angiotensin-System im Herz erbracht? Ein solcher Beweis setzt zunächst eine genaue Definition dessen voraus, was ein solches intrinsisches System überhaupt ausmacht. Während einige Wissenschaftler allein die lokale Bildung des Effektorpeptids für ausschlaggebend halten (Danser und Schalkamp, 1996), die durch Experimente am isolierten perfundierten Rattenherz von De Lannoy *et al.* nachgewiesen werden konnte (De Lannoy *et al.*, 1997; De Lannoy *et al.*, 1998), fordern andere zusätzliche Voraussetzungen. So setzt die Existenz eines lokalen RAS im Herz strenggenommen nicht nur das Vorkommen, sondern auch die Bildung aller Systemkomponenten im Herzgewebe voraus, die außerdem eine gewisse Eigenständigkeit im Bezug auf das zirkulierende System aufweisen sollte (Review: Bader *et al.*, 1994).

Die Expression von Angiotensinogen, ACE und den Ang II-Rezeptoren ist bekannt. Eine de novo-Synthese des Schlüsselenzyms Renin dagegen ist immer noch umstritten. Einigen Gruppen gelang der Nachweis von Renin-mRNA im Herzgewebe (Passier *et al.*, 1996; Dostal *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1995; Flesch *et al.*, 1997), andere fanden zumindest unter nichtstimulierten Bedingungen keine (Ekker *et al.*, 1989; Zhao, *et al.*, 1993; Iwai und Inagami 1992) oder nur schwache Expression (Dzau *et al.*, 1987; Samani *et al.*, 1988). Eine vom zirkulierenden System unabhängige Regulation des RAS wurde nach induziertem Myokardinfarkt in Ratten gezeigt. Lediglich das lokale System wurde aktiviert, nicht aber das zirkulierende RAS (Review: Cleland und Reid, 1996).

Die bis heute uneinheitlichen Ergebnisse der Reninexpressionsanalysen im Herz machten eine erneute Überprüfung unumgänglich. Die Tatsache, daß viele Gruppen Renin-mRNA überhaupt nicht oder nur in geringen Mengen nachweisen konnten, legt den Verdacht nahe, daß die Expression sich nahe am Detektionslimit der jeweiligen Experimente bewegt.

Zusätzlich erforderte die Entdeckung von Exon 1A-Renin (Clausmeyer *et al.*, 1999) bei der Frage nach der Reninexpression im Herz eine eindeutige Zuordnung, um welches Transkript es sich im Fall erfolgreich nachgewiesener Renin-mRNA handelt.

Wegen ihrer größeren Empfindlichkeit haben wir die RT-PCR gegenüber anderen Methoden wie RNase-Protection-Assay oder Northern Blot bevorzugt. Die Verwendung von „nested“ Primern in zwei aufeinanderfolgenden PCRs erlaubte außerdem eine große Zyklenzahl bei unverändert hoher Spezifität.

Die Ergebnisse unserer Experimente schließen eine Expression von sekretorischem Präprorenin aus, entsprechende mRNA konnte in keinem der ca. vierzig untersuchten Rattenherzen diverser Stämme detektiert werden. Ganz andere Resultate erbrachte die Expressionsanalyse mit Primern, die für Exon 1A spezifisch waren. Diese Reninvariante wird kardial exprimiert. Von S. Clausmeyer konnte sogar eine Regulation der Expression gezeigt werden. Untersuchungen von Infarktherzen spontan hypertensiver Ratten (SHR) belegten eine erhöhte Expression im semiquantitativen Vergleich mit scheinoperierten Kontrollorganen des gleichen Stammes, während für Präprorenin codierende mRNA nach wie vor nicht detektiert werden konnte (Clausmeyer *et al.*, 2000).

Die Entdeckung von Exon 1A-Renin läßt auch die bisher durchgeführten Reninexpressionsanalysen in einem völlig neuen Licht erscheinen. Da viele Gruppen (Samani *et al.*, 1988; Okura *et al.*, 1991) ihre Primer im Bereich zwischen Exon 6 oder 7 und Exon 9 wählten, konnte in den entsprechenden Experimenten sowohl Präprorenin- als auch Exon 1A-Renin-mRNA erfaßt werden, die sich nur im Exon 1 unterscheiden. Von der nachgewiesenen cDNA wurde damals angenommen, es handle sich um Präprorenin. Auch das bereits in der Literatur beschriebene Renin, das aus stimulierter Reninexpression in hypertrophierten Herzen (Zhang *et al.*, 1995; Flesch *et al.*, 1997) und nach Myokardinfarkt (Passier *et al.*, 1996) hervorgeht, geht ausschließlich auf Transkripte der Exon 1A-Variante zurück. Der Befund einiger Gruppen (Ekker *et al.*, 1989; Zhao, *et al.*,

1993; Iwai und Inagami 1992), die unter nicht stimulierten Bedingungen trotz einer Primerwahl, die Exon 1 nicht berücksichtigte, keine Renin-mRNA detektieren konnten, ist wohl mit der geringen Anzahl der vorhandenen Transkripte zu erklären.

Beim Vorkommen von mRNA in niedrigen Konzentrationen wird häufig die physiologische Bedeutsamkeit des korrespondierenden Proteins in Frage gestellt. Eine schwache Expression muß aber nicht bedeuten, daß das entsprechende Protein auch in ähnlich geringen Mengen synthetisiert wird. Der Umkehrschluß ist ebensowenig zulässig, in beiden Fällen kann die posttranskriptionelle Regulation eine wichtige Rolle spielen.

Selbst wenn die de novo-Synthese von Renin im gesunden adulten Herz tatsächlich zu niedrig für eine physiologische Funktion sein sollte, darf man dennoch nicht ausschließen, daß aus dem Herzgewebe stammendes Renin unter pathologischen Bedingungen (Zhang *et al.*, 1995; Flesch *et al.*, 1997; Passier *et al.*, 1996) oder während der fetalen Entwicklung (Dostal *et al.*, 1992) von Bedeutung ist. Dostal *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang das Vorkommen von Renin-mRNA in kultivierten neonatalen Kardiomyozyten und Fibroblasten der Ratte.

Im Fall der Ren2-transgenen Ratten führte ein gentechnischer Eingriff zu pathologischen Veränderungen im Herz. Interessanterweise zeigen auch diese Tiere im Vergleich mit SD-Ratten eine veränderte intrakardiale Reninexpression. Wir konnten sowohl endogene Exon 1A-Renin- als auch Ren2-Präprorenin-mRNA im Herzgewebe nachweisen, wobei die Signalstärke der Exon 1A-Variante in den transgenen Tieren die in den SD-Kontrollen übertraf. Unklar bleibt allerdings, ob die in den transgenen Ratten beobachtete Herzhypertrophie auf die erhöhte Exon 1A-Reninexpression, die zusätzliche Ren2-Reninexpression oder die erhöhten Proreninkonzentrationen im Plasma zurückzuführen ist, durch die genügend Prorenin für eine eventuelle Aufnahme aus der Zirkulation zur Verfügung steht.

Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchung lassen eine konkretere Beschreibung des intrakardialen RAS zu. Sie belegen das Vorkommen von Renin-mRNA im Herzen und damit eine mögliche de novo-Synthese aller Komponenten des RAS. Es läßt sich aber nur schwer abschätzen, ob der gesamte intrakardiale Reningehalt auf die nachgewiesene schwache Expression des Exon 1A-Renins zurückgeht. Eine zusätzliche Reninquelle, wie eine Internalisierung aus der Zirkulation, kann man an dieser Stelle nicht ausschließen. Im Gegenteil, dies wird, wie in den folgenden Kapiteln diskutiert, durch meine Untersuchungen unterstützt. Auch bedeutet die Expression der RAS-Komponenten im Herz nicht automatisch, daß die resultierenden Proteine auch in der Lage sind, zu interagieren. Gerade die Entdeckung der Exon 1A-Variante hat uns in diesem Zusammenhang deutlich gemacht, wie ausschlaggebend die intrazelluläre Kompartimentierung für viele Vorgänge sein kann. Möglicherweise erfüllt ein mitochondriales bzw. zytosolisches Renin ganz andere Aufgaben als die Umsetzung von Angiotensinogen. Eine intrazelluläre Lokalisation der Reninaktivität könnte Aufschluß darüber geben, in welchen Kompartimenten der Herzzellen Renin nachweisbar ist.

6.4 Intrakardiales Renin in SD- und Ren2-transgenen Ratten

Die Untersuchung der Reninwerte in Plasma und Herzgewebe war im Bezug auf das intrakardiale Renin in doppelter Hinsicht aufschlußreich. Zum einen ermöglichte die intrazelluläre Lokalisation von Renin einen Vergleich mit den Aussagen der Expressionsuntersuchungen. Der Nachweis von Exon 1A-Transkript, nicht aber von Transkript, das für sekretorisches Renin kodiert, läßt eine mitochondriale oder zytosolische Reninaktivität erwarten. Zum anderen verdeutlichte das Experiment die Abhängigkeit der intrakardialen Reninkonzentrationen von den Plasmawerten, ein Hinweis darauf, daß zumindest ein Teil des kardialen Renins aus der Zirkulation stammt.

Wie bereits von unserem Labor sowie von anderen Gruppen gezeigt, ließ eine bilaterale Nephrektomie auch in diesen Experimenten die Konzentrationen von aktivem Renin im Herz von Schweinen (Danser *et al.*, 1994) und SD-Ratten (Katz *et al.*, 1997) auf kaum detektierbare Mengen abfallen. Das ist zwar ein Indiz dafür, daß unter basalen Bedingungen ein Großteil des intrakardialen Renins renalen Ursprungs ist, aber kein Beweis, da die

Auswirkungen einer bilateralen Nephrektomie auf die kardiale Exon 1A-Expression nicht untersucht wurden.

Eine weitere Korrelation zwischen Plasmawerten und Werten im Herz konnten wir auch in den Ren2-transgenen Ratten zeigen, zumindest im Bezug auf die Proreninwerte, die intrakardial wie auch im Plasma im Vergleich zu SD-Kontrollen erhöht waren. Dieser Befund unterstützt möglicherweise einen der postulierten Internalisierungsmechanismen, nach dem Renin als Prorenin ins Herzgewebe aufgenommen wird. Einige der in den transgenen Tieren beobachteten Symptome scheinen mit dem erhöhten Plasmaprorenin zusammenzuhängen, nicht aber mit der Plasmareninaktivität. So deutet sich eine Korrelation zwischen den hohen Proreninkonzentrationen im Plasma und dem Auftreten einer Herzhypertrophie in den Ren2-transgenen Ratten an (Peters *et al.*, 1996). Der erhöhte Blutdruck scheint dagegen für die Hypertrophieentwicklung nur von untergeordneter Bedeutung zu sein, wie verschiedene Experimente mit RAS-Inhibitoren zeigen. So waren antihypertensive Substanzen trotz ihrer blutdrucksenkenden Wirkung nicht in der Lage, auch die Herzhypertrophie zu vermindern. Im Gegensatz dazu verringerten RAS-Inhibitoren die Hypertrophie sogar in Dosierungen, die den Blutdruck nicht senkten (Böhm *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 1996).

Untersuchungen transgener Fisher-Ratten, die eine leberspezifische Expression von Rattenprorenin aufwiesen, bestätigen die Hypothese einer Korrelation zwischen der Entwicklung einer Herzhypertrophie und Plasmaprorenin. Man fand bei den Fisher-Ratten keinen Hochdruck, aber hohe Proreninwerte im Plasma in Kombination mit einer Herzhypertrophie (Veniant *et al.*, 1996). In Ren2-transgenen Ratten dagegen scheint abgesehen von der Manifestierung einer Herzhypertrophie auch die Hochdruckentwicklung sehr wohl an die Proreninkonzentration im Plasma gekoppelt zu sein. Während der Entwicklung der transgenen Tiere geht dem charakteristischen Blutdruckanstieg weder eine erhöhte Plasmakonzentration von aktivem Renin, noch von Ang II voraus, sondern lediglich ein Anstieg von Prorenin im Plasma (Peters *et al.*, 1996). Auch verschiedene Experimente mit anderen Ansätzen ließen auf eine solche Korrelation in Ren2-transgenen Ratten schließen. So verhinderte die frühzeitige Gabe von Dexamethason die Hochdruckentwicklung bei einer gleichzeitigen Senkung von Plasmaprorenin, während der Reninlevel im Blut unverändert blieb (Djavidani *et al.*, 1995). Die Elimination des aus der Nebenniere stammenden Plasmaprorenins durch bilaterale Adrenalektomie normalisierte den Blutdruck (Bachmann *et al.*, 1992). Tokita dagegen beobachtete keinen Blutdruckabfall

nach Adrenalektomie (Tokita *et al.*, 1994), seine Werte wurden aber bereits 20 Stunden nach dem Eingriff ermittelt, während Bachmann den akuten postoperativen Streß etwas länger abklingen ließ und den Blutdruck erst 4 Tage nach der Operation bestimmte. Bei einigen Tieren beobachtete man im Anschluß an den Eingriff die Neubildung von para-aortalem Nebennierengewebe, worauf sowohl Blutdruck als auch Plasmaprorenin erneut über den Normbereich hinaus anstiegen (J. Peters, unveröffentlichte Daten).

Die Reninbestimmung nach Trennung der Zellbestandteile durch Organellenpräparation ergab in den Ren2-transgenen Ratten eine unterschiedliche Verteilung von aktivem und trypsinaktivierbarem Renin. Während aktives Renin vor allem in Vesikeln nachgewiesen werden konnte, zu denen Lysosomen sowie kleinere Mitochondrien zählen, wurde Prorenin in der Fraktion gefunden, die neben Zytosol auch noch interstitielle Flüssigkeit enthält. Damit ist nicht sicher, ob Prorenin in diesem Fall tatsächlich intrazellulär vorliegt oder aus dem Interstitium stammt. Zum Expressionsprofil in den Herzen der transgenen Tiere würde ein im Zytosol vorliegendes Renin allerdings gut passen, da Exon 1A-Renin aufgrund seiner fehlenden Signalsequenz vermutlich an freien Ribosomen im Zytosol translatiert wird. Auch im zweiten hypothetischen Zielkompartiment, den Mitochondrien, konnte Renin nachgewiesen werden, diesmal als aktives Enzym, während das zytosolische Renin inaktiv vorlag. Diese Aktivierung muß nicht unbedingt durch eine proteolytische Spaltung erfolgt sein, man beobachtet auch eine Enzymaktivierung nach Absenkung des pH-Werts, die lediglich zu einer Konformationsänderung zu führen scheint und damit vermutlich das aktive Zentrum zugänglich macht (Suzuki *et al.*, 1992). Der veränderte pH-Wert innerhalb der Mitochondrien könnte einen solchen Vorgang ermöglichen, wobei allerdings berücksichtigt werden muß, daß der pH nur zwischen den Mitochondrienmembranen im sauren Bereich liegt, im Innern dagegen im alkalischen. Die Vermutung, die mitochondriale Aktivierung könne ohne proteolytische Spaltung stattfinden, wird durch *in vitro* Transporte in isolierte Mitochondrien unterstützt, in denen nach der Internalisierung einer Deletionsvariante vom Präprorenin der Ratte, die wahrscheinlich dem Exon 1A-Renin entspricht, keine Verkürzung des Proteins beobachtet wurde, wie sie bei einer proteolytischen Spaltung zu beobachten wäre (Clausmeyer *et al.*, 1999).

Die Lokalisation von Reninaktivität in lysosomalen Vesikeln dagegen geht höchstwahrscheinlich entweder auf die Expression eines sekretorischen Renins zurück oder auf eine Reninaufnahme in die Zellen. Da die Expression von Rattenpräprorenin im Herz der transgenen Tiere ausgeschlossen werden konnte, könnte ein *de novo* synthetisiertes

sekretorisches Renin nur auf die Expression des Ren2-Gens zurückgehen, dessen mRNA neben dem entsprechenden Transkript für Exon 1A-Renin im Herz von Ren2-transgenen Ratten nachgewiesen wurde. Auf der anderen Seite kann man in diesem Zusammenhang auch eine Internalisierung von Renin aus der Zirkulation nicht ausschließen.

Eindeutiger interpretierbar sind hingegen die Resultate in den Herzen der nicht transgenen SD-Tiere. Die Bestimmung der Reninaktivitäten zeigte hier sowohl für Prorenin als auch für aktives Renin eine intrazelluläre Lokalisation überwiegend in der lysosomalen Fraktion. Da SD-Ratten kein sekretorisches Renin exprimieren, sondern ausschließlich Exon 1A-Renin, das vor allem im Zytosol oder den Mitochondrien vermutet wird, kann die Reninaktivität im lysosomalen Kompartiment in diesem Fall höchstwahrscheinlich nur auf eine zuvor erfolgte Reninaufnahme in die Zelle zurückgeführt werden.

6.5 Aufnahme von Renin ins Herz

Ein wichtiger Punkt, der die Hypothese einer Reninaufnahme aus dem Plasma ins Herzgewebe unterstützt, ist die schon öfter beobachtete Abhängigkeit der kardialen Reninkonzentrationen vom Angebot in der Zirkulation, wie sie auch Danser nachweisen konnte. Er bestimmte die Reninmenge im Herzgewebe und im Plasma von Schweinen, wobei die gemessenen Reninlevel in beiden Fällen so ähnlich waren, daß das Herzrenin nicht aus einer Kontamination mit Plasma stammen konnte (Danser *et al.*, 1994). Die Hypothese eines renalen Ursprungs unterstützend, fielen nach bilateraler Nephrektomie beide Werte unter die Nachweisgrenze ab. Weitere Hinweise darauf, daß das Herz Renin aus dem Plasma aufnehmen kann, lieferten Experimente mit Kaninchen und Affen, denen radioaktiv markiertes Renin in einer Bolusinjektion verabreicht wurde. Sie zeigten nicht nur eine Akkumulation in Leber und Niere, sondern auch, wenn auch in geringerem Ausmaß, im Herz (Skeggs und Dorer, 1989, Hiruma *et al.*, 1988).

Auch bei den von unterschiedlichen Gruppen durchgeführten Experimenten mit isolierten perfundierten Herzen wurde die Bedeutung von Plasmarenin für die Angiotensine im Herz immer wieder deutlich. De Lannoy *et al.* zeigten, daß im isolierten perfundierten Herz keine Ang I-Produktion stattfand, ohne daß dem Perfusat Renin zugesetzt wurde (De Lannoy *et al.*, 1997), wie schon zuvor von Lindpaintner *et al.* beobachtet

(Lindpaintner *et al.*, 1990). Nach De Lannoy *et al.* entsteht Ang I hier vermutlich durch an die Wand der Blutgefäße gebundenes Renin. Auch Müller *et al.* beobachteten eine Anreicherung von Renin im Gewebe des isolierten perfundierten Herzens. Sie verwendeten transgene Ratten, die menschliches Angiotensinogen überexprimierten, um die Effekte von Renin- und Ang I-Infusionen zu vergleichen (Müller *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur Ang I-Infusion hielten Ang II-Freisetzung und Vasokonstriktion nach Beendigung der Renininfusion weiter an, obwohl Renin schnell aus dem Perfusat verschwand. Diese Ergebnisse unterstützen die These einer Anreicherung sowie einer intrakardialen Funktion von Renin.

Für die Aufnahme von Renin ins Gewebe werden inzwischen drei verschiedene Mechanismen diskutiert. Neben einer Internalisierung von aktivem Renin und Prorenin über den Mannose-6-phosphat-Rezeptor (van Kesteren *et al.*, 1997) konnten wir nun eine Mannose-6-phosphat-unabhängige Aufnahme von Prorenin beobachten. Außerdem wurde die Beteiligung von reninbindenden Proteinen (Campbell und Valentijn, 1994) und Reninrezeptoren (Sealey *et al.*, 1996) postuliert. Diese Proteine sind allerdings noch nicht näher charakterisiert worden, es wurde lediglich eine spezifische Membranbindung von Renin beobachtet. Davon abgesehen ist noch nicht geklärt, ob diese Bindung nur dazu dient, Renin an der Zelloberfläche festzuhalten, oder ob nachfolgend eine Aufnahme in die Zelle stattfindet. Es bleibt aber fraglich, ob dieser Mechanismus für eine Reninaufnahme ins Herz relevant ist, da zumindest das von Campbell entdeckte Protein nicht im Herzgewebe vorkommt.

Van Kesteren führte die von ihr beobachtete Reninaufnahme in isolierte Kardiomyozyten und Fibroblasten der Ratte auf eine Interaktion zwischen Mannose-6-phosphat-Rezeptoren und Zuckerresten am Renin und eine nachfolgende Aufnahme zurück. Diese Reste entstehen durch Glykosylierungsreaktionen während der Reifung des Proteins in den Vesikeln des Golgi-Apparates. Van Kesteren *et al.* konnten zeigen, daß Mannose-6-phosphat in der Lage war, die Aufnahme von Renin und seiner Vorstufe Prorenin dosisabhängig zu inhibieren (van Kesteren *et al.*, 1997).

Unsere Aufnahmeversuche mit isolierten Kardiomyozyten lassen auf einen weiteren Aufnahmemechanismus schließen, der unabhängig von Zuckerresten erfolgt, da *in vitro* translatierte Proteine durch die Herstellung in einem Retikulozyten-Lysat-System nicht glykosyliert vorliegen können. Die Herzmuskelzellen internalisierten bevorzugt Prorenin, ein Befund, der auch im Zusammenhang mit den Ren2-transgenen Ratten interessant ist. Das in erster Linie vom Ren2-Gen abgeleitete Prorenin im Plasma der transgenen Tiere (Peters *et al.*, 1993) ist ebenfalls nicht glykosyliert, da diesem Renin entsprechende Glykosylierungsstellen fehlen (Mullins *et al.*, 1989).

Der Zusammenhang zwischen den Mannose-6-phosphat-Rezeptoren, bei denen man einen kationenabhängigen und einen kationenunabhängigen Rezeptor unterscheidet, und dem lysosomalen Kompartiment ist schon seit einiger Zeit bekannt (Review: Dahms *et al.*, 1989). Die Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport von lysosomalen Enzymen, die in den Golgi-Vesikeln über ihre Zuckerreste an Mannose-6-phosphat-Rezeptoren gebunden, so von den zu Sekretion bestimmten Proteinen abgetrennt und in die Lysosomen transportiert werden. Der kationenunabhängige Rezeptor, der mit dem IGF II (Insulin-like growth factor II)-Rezeptor identisch ist, hat eine zusätzliche Funktion. Er bindet und internalisiert extrazelluläre lysosomale Enzyme.

Van Kesteren *et al.* machten die Beobachtung, daß der Zusatz von Ammoniumchlorid oder Monensin, die sowohl die normale Funktion des endosomalen Systems als auch das Recycling und die lysosomale Degradation internalisierter Rezeptoren und Liganden stören, die Aktivierung von aufgenommenem Prorenin hemmt (van Kesteren *et al.*, 1997). Daß die Aktivierung nach einem Transport in die Lysosomen stattfindet, ist deshalb nicht ausgeschlossen. Die Aufnahme des Renin/Mannose-6-phosphat-Rezeptor-Komplexes wurde aber nicht oder nur in geringem Ausmaß gehemmt, im Gegensatz zur der in unseren Experimenten beobachteten Mannose-6-phosphat-unabhängige Aufnahme in isolierte Kardiomyozyten, die durch Zusatz von Ammoniumchlorid verringert wurde. Das von van Kesteren *et al.* eingesetzte rekombinante menschliche Renin und Prorenin wurde in der gleichen Gruppe von Admiraal *et al.* für Aufnahmeversuche in Endothelzellen verwendet. Hier wurde, anders als in den Herzzelleexperimenten, sowohl die Aufnahme von Prorenin als auch seine intrazelluläre Aktivierung inhibiert (Admiraal *et al.*, 1999). Wie in unseren Aufnahmeversuchen scheint auch hier die Endozytose gehemmt zu werden. Eine solche Hemmung konnten wir auch durch den Zusatz von Concanavalin A zeigen, der ebenfalls die Menge des aufgenommenen Prorenins verminderte. Der genaue Mechanis-

mus, über den Concanavalin A seine Wirkung entfaltet, ist noch nicht geklärt, es scheint mit der Internalisierung zu interferieren. Verschiedene Autoren nutzen die Substanz, um eine Umlagerung von Rezeptoren von der Zelloberfläche in intrazelluläre Vesikel zu unterbinden (Waldo *et al.*, 1983; Lohse *et al.*, 1990; Pippig *et al.*, 1995), ein Vorgang, der üblicherweise über eine Endozytose erfolgt. Wir gehen deshalb davon aus, daß auch die Aufnahme nicht glykosylierten Prorenins in die isolierten Herzmuskelzellen auf einen endozytotischen Prozeß zurückgeht. Durch Ammoniumchlorid hingegen wird die normale Funktion des endosomalen Systems und damit die rezeptorvermittelte Endozytose gehemmt (Review: Wileman *et al.*, 1985).

Eine intrazelluläre Aktivierung von internalisiertem Prorenin, wie sie van Kesteren *et al.* beschreiben (van Kesteren *et al.*, 1997), konnte auch aus Reninbestimmungen in Plasma und Herzgewebe von Ren2-transgenen Ratten abgeleitet werden. Anders als in den Kardiomyozytenexperimenten, wo keine proteolytische Aktivierung des aufgenommenen Prorenins beobachtet werden konnte, besteht im Herzen der transgenen Tiere ein wesentlich höherer Anteil des Gesamtrenins aus aktivem Renin als im Plasma, was auf eine intrakardiale Aktivierung schließen läßt. Daß in den von uns durchgeführten Aufnahmeexperimenten mit isolierten Kardiomyozyten keine Aktivierung festgestellt werden konnte, könnte einerseits auf eine sehr langsame Umsetzung zu aktivem Renin zurückgehen, die eigentlich aber auch in den Untersuchungen von van Kesteren hätte auftreten müssen. Andererseits wäre auch eine Enzymaktivität von Prorenin denkbar, wobei das aktive Zentrum dem Substrat Angiotensinogen durch eine Konformationsänderung des Proteins zugänglich gemacht wird. Auch die zusätzliche intrakardiale Reninaktivität in den Experimenten von van Kesteren könnte auf eine solche Aktivierung zurückgehen, der keine proteolytische Spaltung vorausging. Direkte Beweise für ein solches aktives Prorenin *in vivo* gibt es zur Zeit aber nicht.

6.6 Rekombinantes Renin aus der Zellkultur

Eine genauere Untersuchung und Abgrenzung der Mannose-6-phosphat-abhängigen und -unabhängigen Aufnahmemechanismen sowie der funktionellen Bedeutung (beispielsweise für die Angiotensinbildung) setzt eine ausreichende Menge an entsprechenden Reninen voraus, die je nach Verwendungszweck Zuckerreste tragen oder nicht glykosyliert sind. Die Überexpression von Rattenpräprorenin in HepG2-Zellen diente zur Gewinnung großer Mengen an glykosyliertem Prorenin, während die Überexpression von Ren2-Präprorenin nicht glykosyliertes Prorenin lieferte. Die Isolation erfolgte aus den jeweiligen Medien. Besonders für die Gewinnung von glykosyliertem Prorenin war es wichtig, dem synthetisierten Protein über das Präfragment Zugang zu den Golgi-Vesikeln zu verschaffen. Dort findet der Reifungsprozeß von Präprorenin statt, der u.a. eben jene Glykosylierungsreaktionen beinhaltet, die unter Umständen nach der Sezernierung für eine erneute Aufnahme in Zielzellen von Bedeutung sein könnten. Die Proteinbiosynthese sekretorischer Proteine findet durch die Vermittlung einer Signalsequenz, wie sie das Präfragment darstellt, an Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Bereits während der Translation wird das wachsende Protein durch die ER-Membran geschleust und kann später als gereiftes Protein sezerniert werden. Komplettiert werden die so gewonnenen Prorenine durch die Verwendung von glykosyliertem aktivem Renin, das aus der Niere aufgereinigt wurde, und von entsprechend nicht glykosyliertem aktivem Renin, das aus aufgereinigten Zellextrakten der mit aktivem Renin transfizierten HepG2-Zellen stammt.

Die Transfektion aller anderen Konstrukte, denen das Präfragment fehlte, führte zu einer intrazellulären Reninaktivität, diese HepG2-Zellen können so für weitere Untersuchungen verwendet werden, die eine genauere intrazelluläre Lokalisierung von Reninen zum Ziel haben, die wie Exon 1A-Renin nach ihrer de novo-Synthese in der Zelle verbleiben.

Alle resultierenden Proteine befinden sich jetzt in weiteren Versuchen im Einsatz.

6.7 Existiert ein lokales Renin-Angiotensin-System im Herz?

Die anfangs gestellte Frage nach der Existenz eines lokalen RAS im Herzen kann nur unter Berücksichtigung der Definition eines solchen Systems geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, daß alle RAS-Komponenten im Herzgewebe vorkommen, und sowohl Ang I als auch Ang II im Herz produziert werden können. Das für diese Produktion benötigte Renin aber hat höchstwahrscheinlich nicht nur eine einzige Quelle. Klassisches Renin, das aus der Vorstufe Präprorenin hervorgeht, wird im Herz nicht gebildet. Wir konnten aber die Expression von Exon 1A-Renin nachweisen, die Voraussetzung für eine mögliche de novo-Synthese. Die physiologische Funktion dieser Reninvariante ist allerdings noch nicht geklärt. Zugleich findet aber auch eine Aufnahme aus der Zirkulation statt, die unterschiedlichen Mechanismen unterliegt. Demnach scheint ein lokales RAS mit sekretorischem Renin im klassischen Sinn als autarkes, zumindest partiell eigenständiges System, das alle für die lokale Ang II-Produktion benötigten Komponenten in situ synthetisiert, im gesunden Rattenherz nicht zu existieren.

Aber selbst angesichts der Tatsache, daß das Herz-RAS auf renales Renin angewiesen zu sein scheint, kommen dennoch zahlreiche lokale Mechanismen in Frage, mit deren Hilfe das Herz die eigene Ang II-Bildung regulieren könnte. Die Bindung von Renin an die Membran könnte ein Mechanismus sein, der eine Aufnahme von Renin ins Herz ermöglicht (Danser *et al.*, 1994). In mehreren Geweben, darunter auch das Herz, wurde ein reninbindendes Protein gefunden (Review: Danser und Schalekamp, 1996). Die Dichte dieser Bindungsstellen könnte je nach Bedarf variiert werden, um die Angiotensinproduktion zu regulieren. Auch die lokale ACE- bzw. Angiotensinogenkonzentration oder der Abbau von Ang II könnte variieren. Die AT₁-Rezeptor-vermittelte Endozytose könnte die Ang II-Konzentration beeinflussen, und schließlich könnte Renin selbst unter bestimmten pathologischen Bedingungen verstärkt im Herz synthetisiert werden (Dostal *et al.*, 1992; Clausmeyer *et al.*, 2000) und so dem Herz die Möglichkeit zu einer direkten, von der Niere unabhängigen Regulation seiner Ang II-Produktion geben (Review: Danser und Schalekamp, 1996).

Eine genaue Lokalisation der Ang II-Produktion und detailliertere Untersuchungen ihrer Regulation werden uns viele kardiale Vorgänge, die vom RAS beeinflußt werden können, wie die Herzfunktion, die Herzhypertrophie und die Postinfarktveränderungen, besser verstehen lassen.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sekretorisches Renin im Rattenherz nicht aus lokaler Expression und de novo-Synthese, sondern ausschließlich aus einer Aufnahme stammen kann. Eine solche Aufnahme konnte in in vitro Experimenten mit isolierten Kardiomyozyten bestätigt werden, wobei Renin in Form von Prorenin internalisiert wurde. Für diese Aufnahme konnte ein neuer Mechanismus charakterisiert werden, der auf eine Endozytose zurückzugehen scheint und im Gegensatz zu bekannten Mechanismen Mannose-6-phosphat-unabhängig ist. Er scheint besonders im Ren2-transgenen Rattenmodell TGR(mREN2)²⁷ eine wichtige Rolle zu spielen. Hier führt die Überexpression des Ren2-Gens der Maus zu erhöhten Plasmaproreninspiegeln, die mit der Entwicklung einer Herzhypertrophie korrelieren. Intrakardial war die Reninkonzentration in den transgenen Tiere ebenfalls erhöht, wie Reninaktivitätsmessungen in linken Ventrikeln ergaben.

Darüber hinaus wird die Hypothese bezüglich einer möglichen funktionellen Bedeutung eines alternativen Renin-Transkripts unterstützt, da gezeigt werden konnte, daß die Expression von Exon 1A-Renin im Ren2-transgenen Modell im Vergleich zu nicht transgenen Tieren erhöht ist. Zusätzlich konnte hier auch das Ren2-Transkript des Transgens nachgewiesen werden. Das intrakardiale Renin scheint somit aus unterschiedlichen Quellen zu stammen. Die einzelnen Anteile am Gesamtrenin des Herzens und die möglicherweise unterschiedlichen Funktionen sind allerdings noch nicht geklärt.

8 Abkürzungen

8.1 Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Enzyme

ACE: Angiotensin-converting-enzyme

Ang I: Angiotensin I

Ang II: Angiotensin II

Amp: Ampicillin

APS: Ammoniumpersulfat

AT₁-Rezeptor: Angiotensin II-Rezeptor Typ I

AT₂-Rezeptor: Angiotensin II-Rezeptor Typ II

BPB: Bromphenolblau

BSA: Rinderserumalbumin

CIP: Calf-Intestinal-Phosphatase

DEPC: Diethylpyrocarbonat

DMF: Dimethylformamid

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNase: Desoxyribonuklease

DTT: Dithiothreitol

ER: Endoplasmatisches Retikulum

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

FCS: Fetales Kälber Serum (fetal calf serum)

GAP-DH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

IGF II: Insulin-like growth factor II

IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

ISM: interner Standard für das Präprorenin der Maus

ISR: interner Standard für das Präprorenin der Ratte

IVT: in vitro Translationsprodukt

MAP-Kinase: Mitogen aktivierte Proteinkinase

MCS: Multiple Cloning Site

MDH: Malat-Dehydrogenase

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

NH₄Cl: Ammoniumchlorid

NO: Stickstoffmonoxid

PCR: Polymerasekettenreaktion

PMSF: Phenylmethansulfonylfluorid

PNK: Polynukleotidkinase

RAS: Renin-Angiotensin-System

RNase: Ribonuklease

RT-PCR: Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription

SD-Ratten: Sprague-Dawley-Ratten

SDS: Natriumdodecylsulfat

SHR: spontan hypertensive Ratten

SP: saure Phosphatase

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

TGR: transgene Ratte (transgene rat)

TRIS: 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol

X-Gal: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

8.2 Basen, Nukleotide und Nukleinsäuren

A: Adenin

C: Cytidin

G: Guanin

T: Thymin

U: Uracil

NTP: Ribonukleosid-5'-triphosphat (ATP, CTP, GTP, UTP)

dNTP: 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

ddNTP: 2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)

DNA: Desoxyribonukleinsäure

cDNA: (zur mRNA) komplementäre oder „copy“-DNA

RNA: Ribonukleinsäure

mRNA: Boten-RNA

NADH: Nikotinamidadenindinukleotid

NADPH: Nikotinamidadenindinukleotidphosphat

8.3 Aminosäuren

A = Ala: Alanin

C = Cys: Cystein

D = Aps:Asparaginsäure

E = Glu: Glutaminsäure

F = Phe: Phenylalanin

G = Gly: Glycin

H = His: Histidin

I = Ile: Isoleucin

K = Lys: Lysin

L = Leu: Leucin

M = Met: Methionin

N = Asn: Asparagin

P = Pro: Prolin

Q = Gln: Glutamin

R = Arg: Arginin

S = Ser: Serin

T = Thr: Threonin

V = Val: Valin

W = Trp: Tryptophan

Y = Tyr: Tyrosin

8.4 Proteine und Proteinkomplexe

C: Carboxyterminus des Proteins

N: Aminoterminal des Proteins

Maßeinheiten (soweit sie von der SI-Norm abweichen)

Bp: Basenpaare

°C: Grad Celsius

Ci: Curie

Da: Dalton

E: Enzymeinheit

E_{xyz} : Extinktion bei xyz nm

Kbp: Kilobasenpaare

KDa: Kilodalton

Min.: Minute(n)

Sek.: Sekunde(n)

UPM: Umdrehungen pro Minute

v/v: Volumen pro Volumen

w/v: Gewicht pro Volumen

9 Literaturverzeichnis

Admiraal PJJ, van Kesteren CAM, Danser AH, Derx FHM, Sluiter W, Schalekamp MADH: Uptake and proteolytic activation of prorenin by cultured human endothelial cells. *J Hypertens* 1999; **17**: 621-629.

Auffray C, Rougeon F: Purification of mouse immunoglobulin heavy chain mRNAs from myeloma tumor RNA. *Eur J Biochem* 1980; **107**: 303-314.

Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D, Mullins J: Transgenic rats carrying the mouse renin gene - morphological characterization of a low renin hypertension model. *Kidney Int* 1992; **41**: 24-36.

Bader M, Wagner J, Lee M, Ganten D: The role of the renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Hypertension Res* 1994; **17**: 1-16.

Böhm M, Lee MA, Kreutz R, Kim S, Schinke M, Djavidani B, Wagner J, Kaling M, Wiene W, Bader M, Ganten D: Angiotensin II receptor blockade in TGR(mREN2)27: effects of renin-angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions. *J Hypertens* 1995; **13**: 891-899.

Campbell DJ, Valentijn AJ: Identification of vascular renin-binding proteins by chemical cross-linking: inhibition of binding of renin by renin inhibitors. *J Hypertens* 1994; **12** (8): 879-890.

Chamberlain JP: Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with water-soluble fluor sodium salicylate. *Anal Biochem* 1979; **98**: 132-135.

Chatterjee K: Inhibitors of the renin-angiotensin system in established cardiac failure. *Heart* 1996; **76** (suppl 3): 83-91.

Clausmeyer S, Stürzebecher R, Peters J: An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria. *Circ Res* 1999; **84**: 337-344.

Clausmeyer S, Reineke A, Stürzebecher R, Unger T, Peters J: Tissue-specific expression of a rat renin transcript lacking the encoding sequence for the prefragment and its stimulation by myocardial infarction. *Endocrinology* 2000; im Druck.

Cleland SJ, Reid JL: The renin-angiotensin system and the heart: a historical review. *Heart* 1996; **76** (suppl 3): 7-12.

Dahms NM, Lobel P, Kornfeld S: Mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J Biol Chem* 1989; **264**: 12115-12118.

Danser AH: Local renin-angiotensin systems. *Mol Cell Biochem* 1996; **157**: 211-216.

Danser AH, Schalekamp MADH: Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart* 1996; **76** (suppl 3): 28-32.

Danser AH; van Katz JP, Admiraal PJ, Derkx FH, Lamers JM, Verdouw PD, Saxena PR, Schalekamp MADH: Cardiac renin and angiotensins. Uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension* 1994; **24** (1): 37-48.

De Lannoy LM, Danser AH, van Katz JP, Schoemaker RG, Saxena PR, Schalekamp MADH: Renin-angiotensin system components in the interstitial fluid of the isolated perfused rat heart: local production of angiotensin I. *Hypertens* 1997; **29**: 1240-1251.

De Lannoy LM, Danser AH, Bouhuizen AMB, Saxena PR, Schalekamp MADH: Localization and production of angiotensin II in the isolated perfused rat heart. *Hypertens* 1998; **31**:1111-1117.

Djavidani B, Sander M, Kreutz R, Zeh K, Bader M, Mellon SH, Vecsei P, Peters J, Ganten D: Chronic dexamethasone treatment suppresses hypertension development in the transgenic rat TGR(mREN2)27. *J Hypertens* 1995; **13**: 637-645.

Dostal DE, Rothblum KN, Chernin MI, Cooper GR, Baker KM: Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in the neonatal rat heart. *Am J Physiol* 1992; **263**: C838-C850.

DzauVJ, Ellison E, Brody T, Ingelfinger J, Pratt RE: A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. *Endrinology* 1987; **120**: 2334-2338.

Ekker M, Tronik D, Rougeon F: Extra-renal transcription of the renin gene in multiple tissues of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 5155-5158.

Flesch M, Schiffer F, Zolk O, Pinto Y, Rosenkranz S, Hirth-Dietrich C, Arnold G, Paul M, Böhm M: Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 1997; **30**: 383-391.

Fort P, Marty L, Piechaczyk M, Sabrouy SE, Dani C, Jeanteur P, Blanchard JM: Various rat adult tissues express only major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic acids res* 1985; **13** (5): 1431-1442.

Fukamizu A, Nishi K, Cho T, Saitoh M, Nakayama K, Ohkubo H, Nakanishi S, Murakami K. Structure of the rat renin gene. *J Mol Biol* 1988; **201**: 443-450.

Ganten D: Role of animal models in hypertension research. *Hypertension* 1987; **9** (Suppl I): I-2-I-4.

Gomez L, Alelseev A, Aleksandrova L, Brady P, Terzic A: Use of the MTT assay in adult ventricular cardiomyocytes to assess viability: effects of adenosine potassium on cellular survival. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**: 1255-1266.

Hackenthal E, Münter K, Fritsch S: Kidney function and renin processing in transgenic rats TGR(mREN2)27. *Genetic Hypertension Colloque INSERM* 1992; **218**: 349-351.

Hiruma M, Kim S, Ikemoto F, Murakami K, Yamamoto K: Fate of recombinant human renin administered exogenously to anesthetized monkeys. *Hypertension* 1988; **12**: 317-323.

Ikram H: The renin-angiotensin-aldosterone system and cardiac ischaemia. *Heart* 1996; **76** (suppl 3): 60-67.

Ikram H: The renin-angiotensin system and cardiac remodelling after acute myocardial infarction. *Heart* 1996; **76** (suppl 3): 68-72.

Inagami T: Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol* 1999; **10**: S2-S7.

Iwai N, Inagami T: Quantitative analysis of renin gene expression in extrarenal tissues by polymerase chain reaction method. *J Hypertens* 1992; **10**: 717-724.

Katz AM: Cardiomyopathy of overload: a major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med* 1990; **322**: 100-110.

Katz SA, Opsahl JA, Lunzer MM, Forbis LM, Hirsch AT: Effect of bilateral nephrectomy on active renin, angiotensinogen, and renin glycoforms in plasma and myocardium. *Hypertension* 1997; **30** (1): 259-266.

Kurachi S, Sze L, Kurachi K: Improved transfection of HepG2 cells using FuGENE™ 6 transfection reagent. *Biochemica* 1998; **3**: 43-44.

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.

Lee MA, Zhao Y, Peters J, *et al.*: Preparation and analysis of transgenic rats expressing the mouse Ren-2 gene. *J Vasc Med Biol* 1991; **3**: 50-54.

Lee MA, Böhm M, Kim S, Bachmann S, Bachmann J, Bader M, Ganten D: Differential gene expression of renin and angiotensin in the TGR(mREN2)²⁷ transgenic rat. *Hypertens* 1995; **25** (1): 570-580.

Lee-Kirsch MA, Gaudet F, Cardoso MC, Lindpaintner K: Distinct renin isoforms generated by tissue-specific transcription initiation and alternative splicing. *Circ Res* 1999; **84**: 240-246.

Lindpaintner K, Jin MW, Niedermajer N, Wilhelm MJ, Ganten D: Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res* 1990; **67**: 564-573.

Linz W, Schölkens BA, Ganten D: Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens (A)* 1989; **11**: 1325-1350.

Lohse JM, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ: Multiple pathways of rapid β_2 -adrenergic receptor desensitization: delineation with specific inhibitors. *J Biol Chem* 1990; **265**: 3202-3209.

Messing J, Gronenborn B, Müller-Hill B, Hofschneider PH: Filamentous coliphage M 13 as a cloning vehicle: insertion of a HindII fragment of the *lac* regulatory region in the M 13 replicative form *in vitro*. *Proc Natl Sci USA* 1977; **74**: 3642-3646.

Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.

Müller DN, Fischli W, Clozel J-P, Hilgers KF, Bohlender J, Menard J, Busjahn A, Ganten D, Luft FC: Local angiotensin II generation in the rat heart: role of uptake. *Circ res* 1998; **82**: 13-20.

Müller DN, Hilgers KF, Willnow T, Fischli W, Bohlender J, Luft FC: Possible mechanisms of vascular renin uptake and metabolism: effects on local angiotensin formation. *J Hypertens* 1998; **16** (suppl. 2): s3 (Amsterdam, ISH).

Mullins JJ, Sigmund CD, Kane-Haas C, Gross KW: Expression of the DBA/2J Ren-2 gene in the adrenal gland of transgenic mice. *EMBO J* 1989; **8**: 4065-4072.

Mullins JJ, Peters J, Ganten D: Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; **344**: 541-544.

Needleman P, Marshall GR, Sobel BE: Hormone interactions in the isolated rabbit heart. *Circ Res* 1975; **37**: 802-808.

Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1980; **105**: 361-363.

Okura T, Kitami Y, Iwata T, Hiwada K: Quantitative measurement of extra-renal renin mRNA by polymerase chain reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179** (1): 25-31.

Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P: Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res* 1990; **67** (1): 23-24.

Otha K, Kim S, Wanibuchi H, Ganten D, Iwao H: Contribution of local renin-angiotensin system to cardiac hypertrophy, phenotypic modulation, and remodeling in TGR(mREN2)27 transgenic rats. *Circ* 1996; **94**: 785-791.

Panthier JJ, Foote S, Chambraud B, Strosberg AD, Corvol P, Rougeon F: Complete aminoacid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 1982; **298**: 90-92.

Passier RCJJ, Smits JFM, Verluyten MJA, Daemen MJAP: Expression and localisation of renin and angiotensinogen in rat heart after myocardial infarction. *Am J Physiol* 1996; **271**: H1040-H1048.

Peters J, Münter K, Bader M, Hackenthal E, Mullins JJ, Ganten D: Increased adrenal renin in transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)27, and its regulation by cAMP, angiotensin II, and calcium. *J Clin Invest* 1993; **91**: 742-747.

Peters J, Ganten D, Mullins JJ: The development of hypertension in transgenic rats, TGR(mREN2)27. *Progress in Hypertension* 1995; **3**: 1-10.

Peters J: Molekular basis of human hypertension: the role of angiotensin. *Clin Endo Metab* July 1995; **Volume 9**, Number 3: 657-678.

Peters J, Hilgers KF, Maser-Gluth C, Kreutz R: Role of the circulating renin-angiotensin system in the pathogenesis of hypertension in transgenic rats, TGR(mREN2)27. *Clin Exp Hypertens (A)* 1996; **18**: 933-948.

Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ: Sequestration and recycling of β_2 -adrenergic receptors permit receptor resensitization. *Molecular Pharmacology* 1995; **47**: 666-676.

Regitz-Zagrosek V, Fielitz J, Fleck E: Myocardial angiotensin receptors in human hearts. *Basic Res Cardiol* 1998; **93** Suppl 2: 37-42.

Sadoshima J, Xy Y, Slayter HS, Izumo S: Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993; **75**: 977-984.

Samani NJ, Swales JD, Brammar WJ: Expression of the renin gene in extra-renal tissues of the rat. *Biochem J* 1988; **253**: 907-910.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 5463-5467.

Sealey JE, Catanzaro DF, Lavin TN, Gahnem F, Pitarresi T, Hu LF, Laragh JH: Specific prorenin/renin binding (ProBP). Identification and characterisation of a novel membrane site. *Am J Hypertens* 1996; **9**: 491-502.

Skeggs LT, Dorer FE: Incorporation of labeled renin into the tissues of the rabbit. *Am J Hypertens* 1989; **2**: 768-779.

Suzuki F, Takahashi A, Murakami K, Nakamura Y: Rat prorenin is activable at acidic pH. *Genetic Hypertension* 1992; **218**: 499-501.

Tokita Y, Franco-Saenz R, Mulrow PJ, Ganten D: Effects of nephrectomy and adrenalectomie on the renin-angiotensin system of transgenic rats TGR(mREN2)27. *Endocrinology* 1994; **134**: 253-257.

Twentyman PR, Luscombe M: A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987; **56**: 279-285.

Van Kesteren CAM, Danser AH, Derkx FHM, Dekkers DHW, Lamers MJM, Saxena PR, Schalekamp MADH: Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 1997; **30**: 1389-1396.

Veniant M, Menard J, Bruneval P, Morley S, Gonzales MF, Mullins JJ: Vascular damage without hypertension in transgenic rats expressing prorenin exclusively in the liver. *J Clin Invest* 1996; **98**: 1966-1970.

Waldo GL, Northup JK, Perkins JP, Harden TK: Characterization of an altered membrane form of the beta-adrenergic receptor produced during agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 1983; **258** (22): 13900-13908.

Wileman T, Harding C, Stahl P: Receptor-mediated endocytosis. *Biochem J* 1985; **232**: 1-14.

Wolf K, Della Bruna R, Bruckschlegel G, Schunkert H, Riegger GA, Kurtz A: Angiotensin II receptor gene expression in hypertrophied left ventricles of rat hearts. *J Hypertens* 1996; **14** (3): 349-354.

Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y: The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart* 1996; **76** (suppl 3): 33-35.

Zhang X, Dostal DE, Reiss K, Cheng W, Kajstura J, Li P, Huang H, Sonnenblick EH, Meggs L, Baker KM, Anversa P: Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1995; **269**: H1791-H1802.

Zhao Y, Bader M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso M, Zimmermann F, Ganten U, Metzger R, Mullins J, Peters J: Ontogenetic regulation of mouse Ren-2d renin gene in transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)27. *Am J Physiol* 1993; **265**: E699-E707.

10 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmakologischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität, unter der wissenschaftlichen Anleitung von Priv. Doz. Dr. J. Peters. Ihm möchte ich für die interessante Themenstellung, sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine fachliche Unterstützung und die Bereitstellung großzügiger Arbeitsmöglichkeiten danken.

Herrn Prof. Dr. E. Hackenthal danke ich recht herzlich für die Übernahme des Ko-referats.

Mein besonderer Dank gilt Susanne Clausmeyer, die mich beim Erlernen molekularbiologischer Methoden betreut hat. Außerdem danke ich ihr für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Vielmals danken möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe, besonders Jutta Zimmer, Hans-Josef Wrede und Barbara Peters, die durch ihre Hilfsbereitschaft, ihre Geduld und ihr Interesse zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend danke ich meinem Mann Jochen Farrenkopf für seine unermüdliche Unterstützung und seine beratende Tätigkeit bei Softwareproblemen, die von Thomas von Harpe vervollständigt wurde.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Raphaela Farrenkopf, geb. Stürzebecher
Geburtsdatum: 04.04.1971
Geburtsort: Karlsruhe
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1977-1981: Grundschule Karlsbad
1981-1990: Gymnasium Karlsbad, Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife im Mai 1990

Studium

1990-1996: Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Praktisches Jahr von Mai 1995 bis April 1996 in der Antonius-Apotheke, Weinheim und in der Knoll AG, Ludwigshafen. Abschluß als approbierte Apothekerin im Juli 1996
seit August 1996: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Pharmakologischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg bei Priv. Doz. Dr. J. Peters, Erarbeitung der Daten zur vorliegenden Dissertation