

Aus der Klinik für Spezielle Endokrinologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiter: Prof. Dr. med. M. Schott

Regulation des Renin-Gens durch Dexamethason

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Larissa Latia

(2020)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. H. S. Willenberg

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. J. Stegbauer

Meiner Familie in Dankbarkeit

## **Zusammenfassung**

Renin ist ein viel erforschtes Enzym, welches vor allem in der Regulation des Blutdruckes eine herausragende Rolle spielt. Dies spiegelt sich auch in der Tatsache wider, dass in der antihypertensiven Medikation vor allem Inhibitoren des RAAS eingesetzt werden. So wurde 2007 Aliskiren als erster direkter Renininhibitor entwickelt.

Dexamethason als synthetisches Glukokortikoid hat in der Medizin eine breite Anwendung in der Behandlung verschiedenster Erkrankungen, wie beispielsweise in der Behandlung des Hirnödems, als supportive Therapie bei Tumorerkrankungen, *Status asthmaticus* und einigen weiteren. Eine Behandlung mit Dexamethason kann aber auch Nebenwirkungen im Sinne von Hypertension, Stammfettsucht, Osteoporose usw. für die Patienten bedeuten.

In dieser Arbeit wurde untersucht ob ein Zusammenhang zwischen Dexamethason und der Ausschüttung von Renin auf Zellebene besteht. Es zeigte sich auf Promoter-Ebene, dass bereits unter Standardkulturbedingungen eine transkriptionelle Aktivität des Renin-Promoters besteht. Jedoch besteht bei höheren Dexamethason-Konzentrationen die Tendenz zu einer Abnahme der Promoter-Aktivität. Des Weiteren wurde festgestellt, dass auf Protein-Ebene die Renin-Ausschüttung unter höheren Konzentrationen Dexamethason signifikant abnimmt. So kann festgestellt werden, dass die Renin-Konzentration in regelhaften Abhängigkeiten von den Glukokortikoidkonzentrationen steht.

## Summary

Renin is a much studied enzyme, which is quite important in the regulation of hypertension. This is reflected by the fact that especially inhibitors of the RAAS are used in the treatment of hypertension. In 2007, Aliskiren was discovered as the first inhibitor of renin.

Dexamethasone, a synthetic glucocorticoid, is commonly used in modern medicine. It is used in the treatment of brain edema, therapy of tumors, *status asthmaticus* and many more conditions. Treatment with dexamethasone can have side effects such as hypertension, stem obesity, osteoporosis, and many more.

This work studies if there is a context between dexamethasone and the secretion of renin in cells. It was shown that dexamethasone leads to less renin-stimulation on the promoter-level. An immunoassay demonstrated that stimulation with dexamethasone leads to significantly blunted renin-secretion on the protein-level.

In summary, it can be stated that dexamethasone controls the renin-gene and down-regulates the RAAS.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
1N HCl	1x Normale Salzsäure
ACE	Angiotensinogen Converting Enzyme
ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme Hemmer
ADH	Anti diuretisches Hormon
AMP	Adenosinmonophosphat
Ang	Angiotensin
ARP-1	actin-related protein
AT-1	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
AT-2	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2
ATF-1	Activating transcription factor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
COUP-TFII	chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
ddH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DEPC	Diethyldicarbonat
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Zellkulturmedium
E-box	Enhancer-box
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
HOX	Homöobox
Il-1β	Interleukin 1Beta
Il-6	Interleukin 6
JG-like	Juxtaglomerular-like
LB	lysogeny broth
LxRα	Liver X receptor Alpha
LxRβ	Liver X receptor Beta
mg	Milligramm
mRNA	Messenger RNA
NFI	Nuclear Factor I
nm	Nanometer
Nr2f2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
Pal3	Peptidoglycan-associated lipoprotein 3
PBS	Phosphate buffered saline
PBX	Pre B-cell leukemia homeobox
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma
p-Wert	Signifikanz-Wert
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ren	Renin
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.O.C.	microbial growth medium used for the transformation

Sp1/Sp3 ..... Specificity protein  
TBS ..... Tris-buffered saline  
TNF $\alpha$  ..... Tumor-Nekrose-Faktor Alpha  
WT-1 ..... Wilms tumor protein

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
Summary .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	II
1. Einleitung und Fragestellung .....	1
1.1 Renin und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....	1
1.1.1 Renin-Promoter .....	3
1.1.2 Renin-Enhancer .....	4
1.2 Glukokortikosteroide .....	5
1.3 Ziel der Arbeit.....	6
2. Material und Methoden .....	7
2.1 Methodenwahl.....	7
2.2 Zellkultur .....	8
2.2.1 Die As4.1 Zelllinie .....	8
2.2.2 Die Kultivierung von As4.1 Zellen.....	8
2.3 Reporter-gen-Assay und Transformation.....	8
2.3.1 Verwendete Konstrukte .....	8
2.3.2 Transformation.....	10
2.3.3 LB-Agar und LB-Medium.....	11
2.3.4 Maxipräparation .....	11
2.3.5 Versuchsaufbau .....	12
2.3.6 Luziferase.....	12
2.3.7 Messung der Luziferaseaktivität und Auswertung.....	12
2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	13
2.4.1 Versuchsaufbau .....	13
2.4.2 Durchführung .....	13
2.4.3 Auswertung .....	14
3. Ergebnisse: Messwerte und Schlussfolgerungen .....	15
3.1 Studien zur Renin-Promoter-Aktivität .....	15
3.2 Studien zur Prorenin/Renin-Expression .....	17

4. Diskussion .....	22
5. Literaturverzeichnis .....	27
6. Abbildungsverzeichnis .....	32
7. Tabellenverzeichnis.....	33

## **1. Einleitung und Fragestellung**

Mit einer Prävalenz von über 30 % in Europa, ist die arterielle Hypertonie eine häufige Erkrankung. Bei der Blutdruck-Regulation spielen wiederum viele Mechanismen eine Rolle, unter anderem Renin, ein Enzym. Dieses wird bei einem Blutdruckabfall ausgeschüttet und führt über die Spaltung von Angiotensinogen schließlich zu einer Ausschüttung von Aldosteron und antidiuretischem Hormon (ADH), was wiederum zu einer Flüssigkeitsretention führt (Pape et al., 2014). Die herausragende Bedeutung dieses Zyklus in der Regulation des Blutdrucks wird vor allem dann deutlich, wenn man die verschiedenen Gruppen von Antihypertensiva betrachtet. In der *First-line* Behandlung der Hypertonie kommen vor allem ACE-Hemmer zum Einsatz, die letztlich die Bildung von Angiotensin II verhindern. Seit 2007 wurden direkte Reninhibitoren entwickelt – erster Vertreter war Aliskiren, der aufgrund der schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften, der Studienlage und des Preises nicht häufig eingesetzt wird (Karow, 2016).

Glukokortikoide, vor allem jene mit mineralokortikoider Wirkung, können zu einer Natrium- und Wasserretention und konsekutiv zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen. Das in dieser Arbeit verwendete Dexamethason führt, aufgrund der fehlenden mineralokortikoiden Wirkung, nicht zu einer Natriumretention (Karow, 2016).

Klinisch wurde beobachtet, dass Patienten unter Behandlung mit Glukokortikoiden häufig eine Hypertonie entwickeln und auch hohe Renin-Spiegel aufweisen. Ob ein Zusammenhang zwischen der Renin-Synthese und der Glukokortikoidkonzentration besteht, war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht untersucht worden. Vor diesem Hintergrund ist die vorliegende Arbeit entstanden.

### **1.1 Renin und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

Renin wurde 1898 von Tigerstedt und Bergman entdeckt und ist seitdem ein viel erforschtes Enzym. In den Zellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet, ist es vor allem für die Blutdruckregulation von entscheidender Bedeutung. So führt der Schlüsselreiz Blutdruckabfall zu einer erhöhten Ausschüttung von Renin. Renin, als Aspartyl-Protease, führt dann in der Leber zur Spaltung von Angiotensinogen zum Dekapeptid Angiotensin I, was wiederum mittels Angiotensinogen Converting Enzyme (ACE), das in der Lunge exprimiert wird, zum Oktapeptid Angiotensin II gespalten wird. Dieses wirkt stark vasokonstriktiv und führt zur Ausschüttung von Aldosteron und Antidiuretischem Hormon (ADH).

Angiotensin II vermittelt hauptsächlich über Aldosteron seine Wirkung. Es kann jedoch auch direkt über Angiotensin-1 Rezeptoren in der Niere eine Natrium- und Wasserretention bewirken. Zusätzlich stimuliert Angiotensin II über das Zentrale Nervensystem das Durstgefühl. Angiotensin II vermittelt diese Wirkungen über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren AT-1 und AT-2. Diese Rezeptoren finden sich vor

allem in der Niere, im Gehirn und in der Nebenniere, wobei die AT-1 Rezeptoren in adulten Geweben und die AT-2 Rezeptoren eher in fetalen Geweben exprimiert werden (Shanmugam et al., 1994).

Aldosteron, als Mineralokortikoid, führt dann letztlich über den vermehrten Einbau von Natriumkanälen in den Sammelrohren der Niere zu einer Natriumretention und somit zu einer Wasserretention und Blutdrucksteigerung. Gleichzeitig bewirkt es eine vermehrte Ausscheidung von Kalium (Löffler and Petrides, 2013). Der Anstieg von Aldosteron und der daraus resultierende Blutdruckanstieg bewirken schließlich eine Suppression von Renin.

Die klinische Bedeutung von Aldosteron zeigt sich unter anderem in der Pharmakologie. Häufig werden vor allem in der Behandlung der Herzinsuffizienz Aldosteron-Antagonisten wie beispielsweise Spironolacton eingesetzt, die sich als potente Diuretika und Blutdrucksenker erwiesen haben (Karow, 2016). Auf der anderen Seite stehen Erkrankungen wie der primäre Hyperaldosteronismus (Morbus Conn), dessen Symptome sich aus den Wirkungen des Aldosterons ableiten lassen.

Es zeigt sich jedoch auch in verschiedenen Studien, dass das RAAS auch in verschiedenen lokalen Geweben eine Wirkung hat, wie zum Beispiel in Nieren, Fettgewebe, Gehirn, Herz, Gonaden, Pankreas und Plazenta (Bader, 2010; Lavoie and Sigmund, 2003). So wurde beobachtet, dass nach einigen Wochen Therapie mit ACE-Hemmern, die Plasma Angiotensin-II Spiegel wieder im Normbereich waren, der Blutdruck jedoch niedrig blieb. Eine mögliche Erklärung hierfür sind lokale RAAS-Systeme (Bader, 2010).

In der Niere konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Dysregulation des lokalen RAAS zu Hypertonie-induziertem Nierenschaden und –dysfunktion führen kann (Kang et al., 2002). Kang et al. konnten auch zeigen, dass Mäuse deren Angiotensinogen-Synthese gestört ist, weniger häufig einen Nierenschaden entwickeln, als Mäuse mit intakter Angiotensinogen-Synthese (Kang et al., 2002). So wirken auch Inhibitoren des RAAS nephroprotektiv.

Auch im Fettgewebe wurden Teile des RAAS gefunden. Adipozyten exprimieren beispielsweise Angiotensinogen, Angiotensin-Converting-Enzyme, Renin und Angiotensin-II Rezeptoren (Cheng and Leung, 2011). Es konnte demonstriert werden, dass Angiotensin-II Wachstum und Differenzierung sowie die Ausschüttung von Teilen des RAAS und oxidativen Stress in Adipozyten reguliert (Cassis et al., 2008). In einer Studie konnte bewiesen werden, dass Gewichtsreduktion die Plasmakonzentration von RAAS-Komponenten, aber auch die Konzentration von Teilen des RAAS im Fettgewebe, signifikant senkt (Engeli et al., 2005). Andererseits wurde untersucht und gezeigt, dass Telmisartan, als AT-2R1-Antagonist, nicht nur den Blutdruck senkt, sondern auch das viszerale Fettgewebe vermindert (Murakami et al., 2013).

Zudem wurden weitere Signalkaskaden entdeckt (Bader, 2010; Donoghue et al., 2000): Das Enzym *Angiotensin-converting-enzyme 2* – ein Homolog von ACE – beispielsweise, spaltet aus Angiotensin-II Angiotensin-(1-7) (Donoghue et al., 2000). Mas, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der vor allem in Herz, Niere und Ovarien zu finden ist (Reis et al., 2011; Santos et al., 2003), vermittelt die Effekte von Ang-(1-7) (Santos et al., 2003). Diese sind antagonistisch zu den von Angiotensin-II vermittelten Effekten (Zhong et al., 2010). So kommt die Arbeitsgruppe Zhong et al. zu dem Schluss, dass ACE2 ein negativ regulatorisches Element in von Angiotensin-II hervorgerufener kardialer Dysfunktion, myocardialer Fibrose und kardialer Hypertrophie ist (Zhong et al., 2010), da es unter anderem vasodilatatorische Effekte vermittelt.

Die Bedeutung des lokalen RAAS ist jedoch noch nicht abschließend geklärt.

Im Menschen wird Renin von lediglich einem Gen kodiert. Bei Mäusen existieren Stämme, die nur ein Renin-Gen besitzen und andere, die zwei Gene besitzen (Yuan et al., 2007). Das Ren-1 und Ren-2 Gen haben eine 97 %ige Übereinstimmung der Aminosäuren (Sigmund and Gross, 1991). Das Ren-1 Enzym stellt jedoch den Hauptanteil des zirkulierenden Renins und man geht davon aus, dass es auch der Hauptregulator des RAAS ist (Yuan et al., 2007).

### 1.1.1 Renin-Promoter

Der proximale Promoter des Ren-1<sup>c</sup> Gens in As4.1 Zellen liegt von -200 bis +6 *base pair* dem Gen vorgeschaltet (Borensztein et al., 1994). Diese Region ist bei Mäusen, Ratten und Menschen sehr ähnlich. Das Maus Ren-1<sup>c</sup> Gen hat jedoch an der Stelle -80 eine 476bp umfassende Insertion, die weder in der Ratte noch im Menschen vorhanden ist (Burt et al., 1989). Mittlerweile wurden einige Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren identifiziert.

Zum einen gibt es die HOX-PBX Bindungsstelle (*Homeobox - Pre B-cell leukemia homeobox*). Sie liegt im Ren-1<sup>c</sup> Gen an der Stelle -72 bis -50 (Glenn et al., 2013) und ist, wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, von großer Bedeutung für die Renin-Expression (Tanimoto et al., 2008).

Im menschlichen Renin-Gen reguliert PPAR $\gamma$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor Gamma), ein Transkriptionsfaktor, über eine atypische Pal3-Bindungsstelle (*Peptidoglycan-associated lipoprotein 3*), die Renin-Expression. Pal3 bindet außer PPAR $\gamma$  noch den *retinoid X receptor- $\alpha$* . Die Maus und Ratten Pal3 Bindungsstelle zeigt im Gegensatz zur Bindungsstelle in Calu6-Zellen keine Transkriptions-Aktivität bei PPAR $\gamma$ -Aktivierung (Todorov et al., 2007, 2008).

Eine Deletion der Region -197 bis -70 im proximalen Promoter des Ren-1<sup>c</sup> Gens setzt die Renin Transkriptions-Aktivität fast komplett außer Kraft. In dieser Region befinden sich 6 verschiedene *cis-acting elements*, wie zwei NFI-Bindungsstellen (Nuclear Faktor I), eine Sp1/Sp3- Bindungsstelle (*Specify protein*), eine Pb-, eine Pc sowie eine Pd-

Bindungsstelle. All diese Bindungsstellen, bis auf Pb, sind weder in der Ratte, noch in menschlichen Zellen vorhanden - man findet sie lediglich in der Maus (Glenn et al., 2013).

In menschlichen Chorionzellen wurden weitere Bindungsstellen, wie beispielsweise eine Ets-Bindungsstelle (*E26 transformation-specific*), ein *cAMP-responsive element* und eine ARP-1-Bindungsstelle (*Actin releted protein*) gefunden (Borensztein et al., 1994). Das *cAMP-responsive element* bindet Transkriptionsfaktoren wie CREB und ATF-1 (Ying et al., 1997).

Die Bedeutung der LxR $\alpha$ -Bindungsstelle ist bei widersprüchlichen Studienergebnissen relativ unklar. In einer Studie zeigte sich, dass LxR $\alpha$  und LxR $\beta$  als nukleäre Rezeptoren die Renin-Expression mittels direkter Interaktion mit dem Renin-Promoter zu regulieren vermögen (Morello et al., 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von LxR $\alpha$  (Liver x receptor alpha) in mesenchymalen Stammzellen die Renin-Expression stimuliert und eine Differenzierung zu *JG-like* Zellen induziert (Matsushita et al., 2010). Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Arbeit, dass eine Deletion der LxR $\alpha$ -Bindungsstelle im Maus-Promoter weder einen Effekt auf die Renin-Expression, noch auf die Regulation des Renin-Gens hatte (Tanimoto et al., 2008).

### 1.1.2 Renin-Enhancer

Im Ren-1<sup>c</sup> Gen von As4.1 Zellen findet sich ein 242-bp umfassender *Enhancer*, der die Transkriptions-Aktivität um das 50fache steigern kann (Petrovic et al., 1996). Der humane *Enhancer* zeigt eine 71%ige Übereinstimmung mit dem Maus-*Enhancer* (Shi et al., 1999). Ein CRE (*cAMP response element*) Element sowie die angrenzende E-box regulieren die basale Expression. So vermochte in einem Experiment gezeigt werden, dass eine Mutation in diesen Regionen einen annähernd kompletten Ausfall der *Enhancer*-Aktivität in As4.1 Zellen bewirkt (Pan et al., 2001).

Mittlerweile konnten einige negativ und positiv regulatorische Elemente identifiziert werden. Zu den negativ regulatorischen Elementen zählen beispielsweise Endothelin (Pan et al., 2004), mechanische Spannung (Ryan et al., 2000), Calcium (Klar et al., 2005) und Vitamin D (Shi et al., 2001). Ebenfalls supprimieren Cytokine, wie vor allem Oncostatin M, Il-6 (Interleukin-6), Il-1 $\beta$  (Interleukin-1Beta) und TNF $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha) (Baumann et al., 2000; Petrovic et al., 1997; Todorov et al., 2004, 2005) die Renin-Expression. Der *orphan receptor* EAR2 wirkt über eine Bindung an TGACCT supprimierend (Liu et al., 2003). Nr2f2, auch COUP-TFII (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2*) genannt, ist ebenfalls negativ regulierend (Weatherford et al., 2012). WT-1 (Wilms tumor protein 1), ein Transkriptionsfaktor, bindet an eine Bindungsstelle und übt so eine negativ regulierende Funktion aus (Steege et al., 2008). Auch PPAR $\gamma$ , als Transkriptionsfaktor, bewirkt eine Herunterregulation von Renin (Tamura et al., 1997).

Zu den Expressions-steigernden Faktoren gehören die Transkriptionsfaktoren *retinoic acid receptors / retinoic X receptors*, die über eine Bindung an TGACCT wirken (Shi et al., 2001). Eine Mutation in NFI, Sp1/Sp3 sowie einer weiteren noch unbekanntenen Bindungsstelle bewirken eine Abnahme der Renin-Expression (Pan et al., 2003).

## 1.2 Glukokortikosteroide

Glukokortikosteroide zählen zu einer Klasse von Steroidhormonen, die in der Nebennierenrinde gebildet werden. Die Bildung von Cortisol wird über das hypothalamisch-hypophysäre System gesteuert.

Zunächst wird im Hypothalamus *Corticotropin-releasing-Hormon* (CRH), ein Polypeptid, pulsatil freigesetzt, welches in der Hypophyse die Freisetzung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH), einem Peptidhormon, bewirkt. Auch ACTH wird pulsatil sezerniert und stimuliert in der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde die Biosynthese und Sekretion von Cortisol. Cortisol entsteht in verschiedenen Syntheseschritten aus Cholesterin.

Die Effekte der Glukokortikoide im Körper sind sehr vielfältig. Zum einen fördern sie die Gluconeogenese und können somit diabetogen wirken. Zum anderen haben sie einen katabolen und lipolytischen Effekt. Eine Wirkung, die auch medizinisch genutzt wird, ist die antiphlogistische Wirkung der Glukokortikoide, vermittelt durch eine Hemmung verschiedener Cytokine. Durch ihre mineralokortikoide Wirkung, beeinflussen sie auch den Mineralhaushalt und somit den Blutdruck. Diese Wirkung ist jedoch bei den natürlichen Glukokortikoiden stärker ausgeprägt als bei den synthetischen (Löffler and Petrides, 2013).

Dexamethason (9-Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon) ist ein synthetisch hergestelltes Glukokortikoid. Um die Wirkung der verschiedenen synthetischen Glukokortikoide mit den körpereigenen vergleichen zu können, zieht man Tabellen mit relativen Wirkstärken zu Rate. Dies hat vor allem in der Medizin eine hohe Bedeutung. Aus den Tabellen ergibt sich, dass Dexamethason zu den langwirksamen Glukokortikoiden mit einer hohen glukokortikoiden Potenz, und einer vernachlässigbaren mineralokortikoiden Potenz gehört. In der Medizin findet Dexamethason vor allem im Dexamethason-Hemmtest, zum Ausschluss eines Cushing-Syndroms, Verwendung. Therapeutisch kommt es bei einem Hirnödem, *Status asthmaticus*, adrenogenitalem Syndrom, zytostatikainduziertem Erbrechen und einigen weiteren Indikationen zum Tragen. Die Nebenwirkungen ergeben sich aus der physiologischen Wirkung der Glukokortikoide: Osteoporose, Muskelatrophie, Stammfettsucht, Hypertonie und weiteren (Karow, 2016).

Pandey et al. konnten in einer Studie mit transgenen Mäusen feststellen, dass Dexamethason RAAS-vermittelt eine Hypertonie induziert (Pandey et al., 2015). Sie stellten zudem fest, dass dies nur in einem Haplotypen des menschlichen

Angiotensinogen-Promoters der Fall ist. Der Haplotyp -6A scheint Dexamethason-abhängig eine Hypertonie zu induzieren, während der Haplotyp -6G protektiv wirkt.

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Im Rahmen der klinischen Beobachtung, dass sich bei Patienten unter Behandlung mit Glukokortikoiden und Entwicklung einer sekundären arteriellen Hypertonie Schwierigkeiten bei der Blutdruckeinstellung ergaben und diese Patienten erhöhte Renin-Spiegel aufwiesen, wurden folgende Hypothesen aufgestellt, die sich nur experimentell überprüfen lassen, weil die bisherigen klinischen Beobachtungen bislang für eine aussagefähige Studie nicht ausreichen:

- Die Renin-Synthese steht in regelhaften Abhängigkeiten von den Glukokortikoidkonzentrationen im Serum.
- Mäßige Erhöhung zirkulierenden Cortisols führt zur Stimulation von Renin.
- Starke Erhöhung zirkulierenden Cortisols führt zur Suppression von Renin, weil der mineralokortikoide Effekt den der direkten Stimulation überwiegt.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, sollte auf Promoter- und auf Protein-Ebene nach dosisabhängiger Stimulation mit Dexamethason die Renin-Expression erstmalig untersucht werden. Hierzu sollte analysiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Renin-Synthese und der Glukokortikoidkonzentration vorliegt. Stichproben wurden als hinreichend befunden, um die Möglichkeit des genannten Zusammenhangs zwischen Renin-Synthese und Glukokortikoidkonzentration zu überprüfen. Im positiven Falle wäre dann dieser Zusammenhang in Folgestudien genauer zu definieren.

## **2. Material und Methoden**

Im Folgenden soll die Methodenwahl dargestellt werden. Anschließend wird das Vorgehen bei der Zellkultur und schließlich die Messung der Promoter-Aktivität und der Renin-Synthese dargelegt.

### **2.1 Methodenwahl**

Um die zuvor dargelegte Hypothese auf experimenteller Ebene zu überprüfen, waren Renin-sezernierende Zellen notwendig. Aktuell existieren zwei Zelllinien, die in Studien verwendet werden. Zum einen Calu6 Zellen und zum anderen As4.1 Zellen. Die Calu-6 Zellen zeigten sich initial als humane Zelllinie sehr vielversprechend für Studien über Renin. Es handelt sich um Zellen, die einem pulmonalen Karzinom entstammen (Lang et al., 1995). Demgegenüber steht die As4.1 Zelllinie, die einer transgenen Maus entstammt, jedoch Ähnlichkeiten zu den juxtaglomerulären Zellen der Niere besitzen (Pan and Gross, 2005). Die As4.1 Zellen besitzen gegenüber den Calu6-Zellen den Vorteil, dass sie auch über längere Zeit konstante Mengen an Renin sezernieren, weswegen sie für die vorliegenden Studien präferiert wurden (Sigmund et al., 1990a).

Des Weiteren wurde ein Plasmid benötigt, welches das Renin-Gen enthält. PhD Curt D. Sigmund von der University of Iowa und seine Forschungsgruppe stellten in einer ihrer vielen Studien zu Renin das Plasmid m4.1kP-luc her (Shi et al., 1999). Dieses wurde bereits in vielen Studien zur Expression von Renin verwendet. Mit freundlicher Genehmigung von PhD Curt D. Sigmund von der University of Iowa kam auch in unseren Versuchen das Renin-Plasmid m4.1kP-luc zur Anwendung. Eine zusammenfassende Darstellung zur Herstellung des Konstruktes m4.1kP-luc finden Sie in dem Kapitel „Reportergen-Assay und Transformation“.

Um zu überprüfen ob die Anwesenheit von Dexamethason zu einer Aktivierung oder Inaktivierung des Renin-Promoters führt, entschlossen wir uns einen bereits in einigen Studien zur Anwendung gekommenen Luziferase-Assay durchzuführen (Klar et al., 2004; Ryan et al., 2000). Luziferase-Assays sind ein seit Jahren verwendetes gängiges Verfahren, um mittels Lumineszenz die Aktivität von Promotern zu überprüfen (Greer and Szalay, 2002).

In einem letzten Schritt sollte untersucht werden, ob sich die Renin-Synthese der As4.1 Zellen nach einer Zugabe von Dexamethason verändert. Ein in der Medizin gängiges immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen ist der Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) (Löffler and Petrides, 2013). Wir verwendeten in der vorliegenden Arbeit einen speziellen Maus-ELISA, der bereits erfolgreich in anderen Studien zur Anwendung kam (Giani et al., 2014; Peng et al., 2013).

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Die As4.1 Zelllinie**

Die As4.1 Zelllinie stammt aus dem Aszitespunktat einer 6 Monate alten weiblichen transgenen Maus, bei der ein intraparenchymaler Nierentumor mittels Tumorigenese induziert wurde (Produktinformation des Herstellers ATCC). Die transgenen Mäuse enthalten das Renin T Antigen Fusionsgen, pR2d4.6TAG, welches eine transkriptionelle Fusion zwischen der 4,6kb Ren-2d 5' Sequenz und dem Strukturgen für das SV40 T Antigen darstellt (Petrovic et al., 1997). Das T-Antigen besitzt die Fähigkeit eine Neoplasie in bestimmten Zellen zu induzieren, was genutzt wurde, um die Renin exprimierenden Zellen zu vermehren.

Durch den endogenen Ren-1c Locus sind die Zellen in der Lage, eine hohe Menge an Renin-mRNA zu produzieren. Es wird geschätzt, dass jede Zelle ca. 1000 bis 2000 Kopien Renin-mRNA besitzt. Die As4.1 Zellen sezernieren im Wesentlichen Prorenin, besitzen jedoch auch eine aktive Form von Renin in Speichergranula (Sigmund et al., 1990).

Zwar wurde die Expression von Renin auch in verschiedenen humanen Zelllinien, wie zum Beispiel diverse JG Zelltumoren oder bestimmte Wilms Tumoren, beschrieben, jedoch sank nach Langzeit-Kultivierung die Menge an sezerniertem Renin kontinuierlich ab. Dies ist bei der As4.1 Zelllinie nicht der Fall, sodass auch bei Langzeit-Kultivierung die Menge an sezerniertem Renin konstant bleibt (Sigmund et al., 1990).

### **2.2.2 Die Kultivierung von As4.1 Zellen**

Die Zellen wurden in DMEM Medium (ATCC) mit 10 % fetalem Kälberserum (Invitrogen) und 5 % Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) kultiviert. Die Atmosphäre im Brutschrank bestand aus 95 % Raumluft und 5 % Kohlendioxid und war in Wasserdampf gesättigt. In Abhängigkeit der Zelldichte wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt. Bei ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS (Gibco) gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit Accutase (PAA Laboratories) inkubiert. Im Anschluss wurden die in Accutase gelösten Zellen in einem Tube bei 1400 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das nun entstandene Pellett wurde daraufhin in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann mittels einer Neubauer Zählkammer für das darauffolgende Experiment ausgezählt und in 24-Well Platten verteilt.

## **2.3 Reporter-gen-Assay und Transformation**

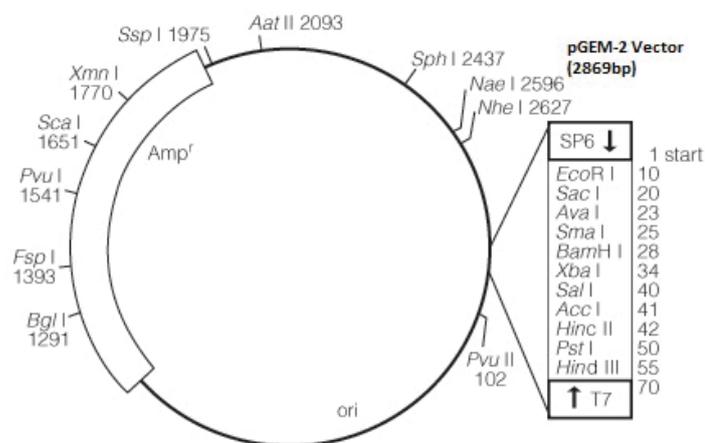
### **2.3.1 Verwendete Konstrukte**

Ein Reporter-gen-Assay wurde zur Messung der Promoter-Aktivität des Renin-Gens durchgeführt. Mit freundlicher Genehmigung von PhD Curt D. Sigmund von der University of Iowa wurde in unseren Versuchen das Renin-Plasmid m4.1kP-luc

verwendet. Um das Konstrukt herzustellen, wurde zunächst die 4.1-kb 5'-Region des Maus Ren-1c Gens von RIC-4.1 CAT in den pGEM-2 Vektor (Abb. 1) subkloniert. Der daraus entstehende pGEM-m4.1 K Vektor wurde seinerseits in pGL2-basic (Abb. 2) subkloniert, so dass das m4.1kP-luc Konstrukt entstand (Shi et al., 1999).

In den Versuchen wurde des Weiteren das Konstrukt pRL-TK (Abb. 3) zur internen Kontrolle sowie zur Normalisierung der transkriptionellen Aktivität verwendet. Es enthält die *Renilla luciferase*, die aus der *Renilla reniformis*, einer zu den Seefedern gehörenden Oktokorallenart, kloniert wurde, sowie den Herpes simplex Virus Thymidinkinase Promoter, um das Level der Renilla luciferase Expression gleichmäßig niedrig bis moderat zu halten (Sherf et al., 1996).

Das Konstrukt pGL2-basic (Abb. 2) wurde zudem als Leervektor für die Negativkontrolle verwendet (Sherf et al., 1996).



**Abb. 1**

Die Plasmidkarte des pGEM-2 Vektors modifiziert nach den Produktinformationen des Herstellers (Promega)

Die Abbildung zeigt den Vektor, in den die 4.1-kb 5'-Region des Maus Ren-1c Gens von RIC-4.1 CAT subkloniert wurde, um so den pGEM-m4.1 K Vektor (nicht dargestellt) zu erhalten.

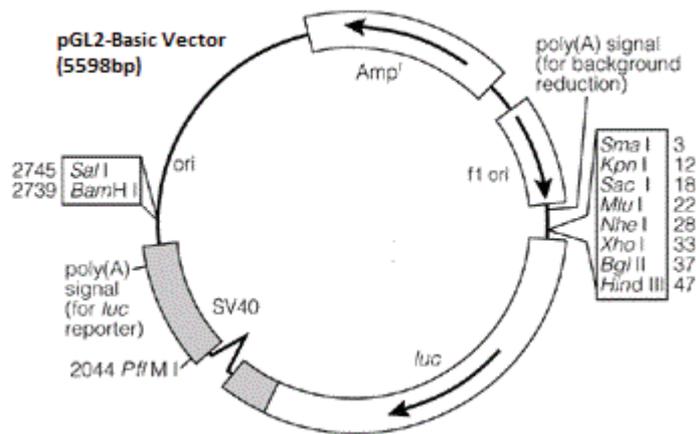


Abb. 2

Die Plasmidkarte des pGL2-Basic Vektors modifiziert nach den Produktinformationen des Herstellers (Promega)

In diesen Vektor wurde der pGEM-m4.1 K Vektor kloniert, um m4.1kP-luc zu erhalten. Er wurde zudem als Leervektor für die Negativkontrolle verwendet.

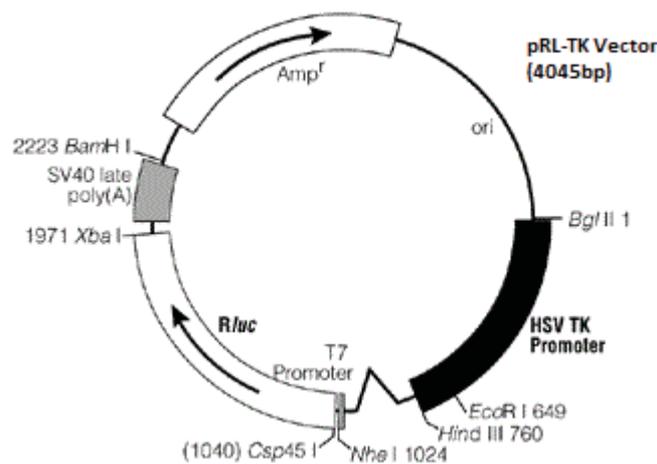


Abb. 3

Die Plasmidkarte des pRL-TK Vektors modifiziert nach den Produktinformationen des Herstellers (Promega).

Dieser Vektor wurde zur internen Kontrolle sowie zur Normalisierung der transkriptionellen Aktivität verwendet.

### 2.3.2 Transformation

Um das auf Filterpapier erhaltene Plasmid zu lösen, wurde das Filterpapier mit 15 µl RNase freiem Wasser in ein Eppi gegeben und für 5 Minuten zentrifugiert. Die bei minus 80°C gelagerten Bakterien (Invitrogen, One Shot, TOP10 E.coli) wurden auf Eis langsam aufgetaut. Anschließend wurden die Bakterien in ein Eppi überführt und zu diesen 2-5 µl des Plasmids hinzugegeben, vorsichtig geschüttelt und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Bei 42°C wurde dann der Hitzeschock im Thermomixer für 30 Sekunden durchgeführt. Danach wurde das Reaktionsgefäß für 2 Minuten auf Eis

gelagert. Im Anschluss wurde das bereits auf 37°C vorgewärmte S.O.C auf die Bakteriensuspension gegeben und für 1 Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zuletzt wurden 20-200 µl der Bakteriensuspension auf einer Agarplatte (LB+Ampicillin) ausgestrichen. Nachdem die Bakterien kurz angetrocknet wurden, wurde die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Kolonie vom Agar genommen und in ein Tube mit 3 ml LB-Medium und 3 µl Ampicillin (für das Ampicillin wurden 125 mg abgewogen und in 1 ml DEPC gelöst) gegeben. Für 8 Stunden wurde das Tube bei 37°C gelagert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium und 100 µl Ampicillin und 100 µl der Bakteriensuspension in einen zuvor autoklavierten Erlenmeyer-Kolben gegeben und bei 37°C schüttelnd für 12-16 Stunden inkubiert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension bei 6000 × g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde für die Maxipräparation verwendet.

### **2.3.3 LB-Agar und LB-Medium**

Für 500 ml LB-Medium wurden 5 g BactoTrypton, 2,5 g Hefe-Extrakt, 2,5 g NaCl verwendet, in 500 ml ddH<sub>2</sub>O gelöst und dann autoklaviert. Für den Agar wurde zusätzlich 6,75 g Agar hinzugefügt. Sobald das Medium eine Temperatur von ca. 50°C erreicht hat, wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

### **2.3.4 Maxipräparation**

Die Vervielfältigung der Plasmide wurde mittels Maxipräparation (Qiagen) erreicht. Das Pellet (siehe oben) wurde in 10 ml P1 Puffer resuspendiert. Dem P1 Puffer wurde zuvor die RNase A Lösung sowie das LyseBlue Reagenz zugeführt. Das Pellett wurde solange resuspendiert, bis keine Zellklumpen mehr zu sehen waren.

In einem nächsten Schritt wurden 10 ml des Puffers P2 zugegeben und anschließend 4-6-mal invertiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der Zugabe von LyseBlue Reagenz, nimmt die Suspension eine blaue Farbe an.

Im Weiteren wurden 10 ml des zuvor bei 4°C gekühlten Puffers P3 hinzugegeben und ebenfalls 4-6-mal invertiert und im Anschluss für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wird die Suspension, bei richtiger Anwendung, farblos.

Nach 20minütiger Inkubation wurde die Suspension zunächst geschüttelt und dann bei  $\geq 20.000 \times g$  bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen und ein weiteres Mal bei  $\geq 20.000 \times g$  bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Auch hier wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, entnommen.

Mittels 10 ml QBT Puffer wurde eine Qiagen-tip 500 Säule äquilibriert. Im Anschluss wurde der Überstand der Säule zugeführt. Nach erfolgtem Durchfluss wurde die Säule zweimalig mit 30 ml QC Puffer gewaschen.

Anschließend wurde die DNA durch Hinzufügen von 15 ml QF Puffer gelöst und in einem 50 ml Tube gesammelt.

Durch Gabe von 10,5 ml bei Raumtemperatur gelagertem Isopropanol zu der gelösten DNA, wurde ein Ausfällen der DNA induziert. Bei  $\geq 15.000 \times g$  wurde die Lösung bei  $4^{\circ}C$  für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Das nun erhaltene Pellett wurde mit 5ml bei Raumtemperatur gelagertem 70%igem Ethanol gewaschen und danach bei  $\geq 15.000 \times g$  für 10 Minuten zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen.

In einem letzten Schritt wurde das Pellett für 7 Minuten getrocknet. Die DNA wurde dann mit 200  $\mu$ l TE-Puffer neu gelöst.

### **2.3.5 Versuchsaufbau**

Zunächst wurden die As4.1 Zellen in einer Zelldichte von ca.  $2 \times 10^4$  Zellen in einer 24-Well-Platte (Nunc) ausgesät und über Nacht inkubiert. Mittels Fugene6 (Roche) wurden dann die Plasmide in die Zellen eingebracht. Die Transfektion erfolgte im Verhältnis 3:1 (Fugene : DNA). Es wurden jeweils 1,5  $\mu$ l Fugene, 0,25  $\mu$ g des m4.1kP-luc Renin-Promoter-Konstrukts und 0,25  $\mu$ g des pRL-TK Kontrollplasmids pro Well verwendet. In der Negativkontrolle wurde anstatt des m4.1kP-luc Renin-Promoter-Konstrukts das pGL2-basic Plasmid eingebracht. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit Dexamethason (Sigma) stimuliert. Zur Stimulation wurden je 0,3 mg/dl, 3 mg/dl und 30 mg/dl Dexamethason, gelöst in PBS (Gibco), zum DMEM-Medium in die Wells hinzugegeben und für 24 Stunden inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde PBS (Gibco) ohne Zusatz verwendet.

### **2.3.6 Luziferase**

Die Luziferase ist ein in den Leuchtorganen lumineszenzfähiger Organismen vorkommendes Enzym. Dieses katalysiert die Oxidation von *Luciferin* in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, wobei ein Oxidationsprodukt entsteht, welches Biolumineszenz verursacht (Löffler and Petrides, 2013). Gebräuchlich sind die *Firefly-Luciferasen*, bei denen Luciferol, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht reagieren und *Renilla-Luciferasen*, die nur Luciferol und Sauerstoff (kein ATP) zur Reaktion benötigen (Sherf et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde ein *Dual-Luciferase Reporter Assay* verwendet, der sowohl die *Firefly-Luciferase Photinus pyralis* als auch *Renilla reniformis* beinhaltet. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass *Renilla reniformis* eine interne Kontrolle darstellt.

### **2.3.7 Messung der Luziferaseaktivität und Auswertung**

Zur Messung der Luziferaseaktivität kam der *Dual-Luciferase Reporter Assay* (Promega) zur Anwendung. Zunächst wurden die Zellen mit PBS (Gibco) gewaschen, um anschließend mittels PLB lysiert zu werden. Dazu wurden 100  $\mu$ l PLB pro Well hinzugegeben und im Anschluss für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem *plate shaker* geschüttelt. Danach wurden 20  $\mu$ l des Lysats in ein Tube gegeben. Zu diesem wurden im ersten Schritt 100  $\mu$ l der Substratlösung Luciferase Assay Reagenz II

gegeben. Dies wurde dann im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold Technologies) hinsichtlich der *Firefly-Luciferase*-Aktivität gemessen. In einem zweiten Schritt wurde zudem noch eine Stopp-Lösung *Stop and Glo Reagent* hinzugefügt und ein weiteres Mal gemessen, um die Aktivität der in dem pRL-TK Plasmid enthaltenen *Renilla luciferase* zu bestimmen.

Für die Auswertung wurde der Quotient aus der Aktivität der *Firefly-Luciferase* und der *Renilla luciferase* gebildet. Jedes Experiment wurde in Triplets durchgeführt und der Mittelwert dieser ermittelt. Der Mittelwert wurde dann in die weiteren Berechnungen einbezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Tests. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden für signifikant erachtet. Die Auswertung erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel 2010 und SPSS Version 17.0. Die Ergebnisse sind weiter unten dargestellt.

## **2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay**

Der ELISA ist ein gängiges immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen, Viren oder Hormonen (Löffler and Petrides, 2013). In diesem Verfahren werden die zu untersuchenden Antigene mit einem Antikörper gebunden. Diese „Bindung“ wird in einem zweiten Schritt mit einem zweiten Antikörper markiert und führt so zu einer Farbreaktion, die schließlich in einem Spektrophotometer quantifiziert wird. In jedem Versuch gibt es eine Standardreihe und mehrere Verdünnungsreihen um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Von diesem Verfahren gibt es mittlerweile verschiedene Abwandlungen (Luttmann et al., 2014).

### **2.4.1 Versuchsaufbau**

Zunächst wurden die Zellen in einer Dichte von ca.  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well in 24-Well Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden sie analog zum Reporter-gen-Assay mit 0,3 mg/dl, 3 mg/dl und 30 mg/dl Dexamethason (Sigma), welches zum DMEM-Medium hinzugefügt wurde, stimuliert. Zu der Kontrollgruppe wurde statt Dexamethason PBS (Gibco) hinzugegeben. Nach 24 Stunden Stimulation wurde der Überstand abgesaugt und unmittelbar für den *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) verwendet.

### **2.4.2 Durchführung**

In den Versuchen benutzten wir das *Mouse Prorenin/Renin Total Antigen ELISA Kit* (Innovative Research, Inc.). Zunächst wurde die Standardreihe vorbereitet. Der Überstand musste auf Grund zu hoher Renin-Konzentrationen 1:50 mit *blocking buffer*, bestehend aus 3 % BSA in TBS gelöst, verdünnt werden. Anschließend wurde die Standardreihe und die Proben pipettiert, wobei 100  $\mu$ l pro *Well* verwendet wurde. Danach wurde die Platte für 30 Minuten bei 300 rpm auf einem *plate shaker* geschüttelt. Im Anschluss wurde die Platte drei Mal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen und vorsichtig ausgeklopft.

Im nächsten Schritt wurde der Antikörper hinzugefügt. Es wurden 100 µl pro *Well* verwendet und wieder für 30 Minuten bei 300 rpm geschüttelt. Nachfolgend wurde die Platte wieder drei Mal gewaschen und ausgeklopft.

Anschließend wurden 100 µl des 1:100.000 verdünnten Streptavidin-HRP zu den *Wells* hinzugegeben und analog zu den Schritten zuvor geschüttelt, gewaschen und ausgeklopft.

Zuletzt wurde 100 µl TMB-Substrat zu den *Wells* zugefügt und für 5 Minuten geschüttelt. Infolge veränderte sich die Farbe von farblos zu unterschiedlichen Blautönen. Die Reaktion wurde mittels Zugabe von 50 µl 1N HCl pro *Well* gestoppt, wobei sich die Farbe von Blau- zu Gelbtönen veränderte.

Die Platte wurde dann zum Messen bei 450 nm in ein Spectrophotometer gegeben.

### **2.4.3 Auswertung**

Für die Auswertung wurden die Rohdaten der optischen Dichte gemittelt, die mittels Spectrophotometer bei 450 nm gemessen wurden. Jedes Experiment wurde in Triplets durchgeführt und der Mittelwert dieser ermittelt. Der Mittelwert wurde dann in die weiteren Berechnungen einbezogen. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden für signifikant erachtet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Wilcoxon-Test und den Programmen Microsoft Excel 2010 und MedCalc – Version 17.8.5. Die Ergebnisse sind weiter unten dargestellt.

### 3. Ergebnisse: Messwerte und Schlussfolgerungen

#### 3.1 Studien zur Renin-Promoter-Aktivität

Um die Promoter-Aktivität festzustellen, wurde, wie im vorherigen Kapitel dargelegt (Kapitel 2, Seite 17), ein *Reporter-Gen-Assay* durchgeführt. Die genauen Informationen zur Durchführung der Experimente entnehmen Sie bitte dem Kapitel 2 „Reporter-Gen-Assay und Transformation“.

Abb. 4 zeigt in einem Säulendiagramm die mittlere Luziferase-Aktivität unter den verschiedenen Stimulationen mit Dexamethason für pGL2-basic versus m4.1kP-luc. pGL2-basic diente hier als Negativkontrolle. Stimulationen mit Dexamethason zeigten keine Luziferase-Aktivität. Stimulationen des Vektors m4.1kP-luc hingegen zeigten verschiedene Luziferase-Aktivitäten je nach Dexamethason-Konzentration. Bei höheren Dexamethason-Konzentrationen nahm die Luziferase-Aktivität ab.

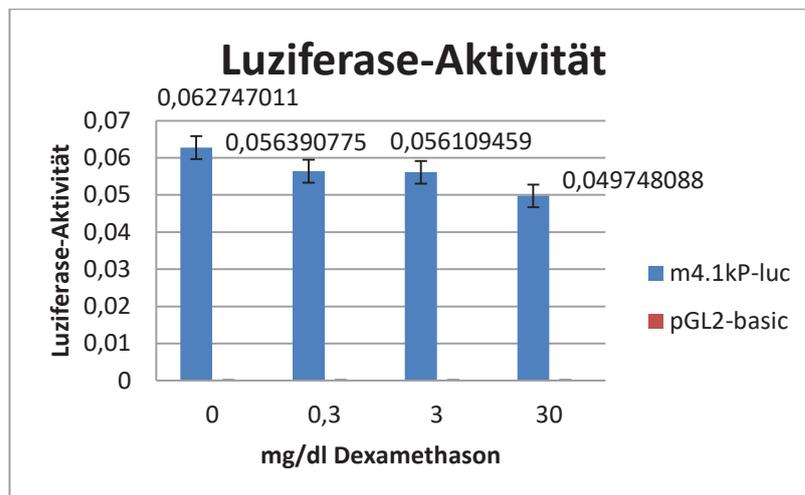


Abb. 4

Die Abbildung zeigt auf der Ordinate die Luziferase-Aktivität von dem Leervektor pGL2-basic als Negativkontrolle im Vergleich zu m4.1kP-luc unter den verschiedenen Konzentrationen mit Dexamethason in mg/dl (auf der Abszisse). Es wird deutlich, dass die Luziferase-Aktivität unter zunehmender Konzentration mit Dexamethason abnimmt. In der Negativkontrolle zeigt sich keine Luziferase-Aktivität.

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für die verschiedenen Bedingungen (m4.1kP-luc, Leervektor, vier verschiedene Dexamethason-Konzentrationen) dargestellt.

Plasmid (1=mit; 0=ohne)	Konzentration (1=0; 2=0,3; 3=3; 4=30)	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error of Mean	Minimum	Maximum
pGL2-basic Leervektor	0,0	,0000560	3	,00004940	,00002852	,00001	,00011
	0,3	,0000948	3	,00011420	,00006593	,00002	,00023
	3,0	,0000894	3	,00010330	,00005964	,00001	,00021
	30,0	,0001077	3	,00011863	,00006849	,00002	,00024
	Total	,0000870	12	,00008781	,00002535	,00001	,00024
m4.1kP-luc	0,0	,0627470	3	,03110821	,01796033	,03816	,09772
	0,3	,0563908	3	,05301851	,03061025	,02116	,11737
	3,0	,0561095	3	,04596246	,02653644	,02466	,10886
	30,0	,0497481	3	,05333876	,03079515	,01282	,11090
	Total	,0562488	12	,04014303	,01158829	,01282	,11737

**Tabelle 1**

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen für die verschiedenen Bedingungen. Es zeigt sich, dass der Leervektor keinem Einfluss von Dexamethason unterliegt. Zudem wird erkenntlich, dass unter zunehmenden Konzentrationen von Dexamethason einen Abfall der Luziferase-Aktivität erfolgt.

Die hier dargestellten Daten stellen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten und dessen Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-U-Tests. Ab einem  $p$ -Wert von  $< 0.05$  wurden die Daten als statistisch signifikant gewertet.

Der Kruskal-Wallis-Test ergab keinen signifikanten Unterschied in der Luziferase-Aktivität unter den vier verschiedenen Stimulationen für pGL2-basic,  $\chi^2(3)=0.64$ ,  $p = 0.89$ , sodass gezeigt werden konnte, dass der Vektor keinem Einfluss von Dexamethason unterliegt.

Mann-Whitney-U-Tests zeigten hingegen unter allen vier Stimulationen eine gesteigerte Luziferase-Aktivität des m4.1kP-luc Plasmids im Vergleich zum Leervektor (Tabelle 1); Konzentration 0,0:  $U = 0.00$ ,  $Z = -1.96$ ,  $p = 0.049$ ; Konzentration 0,3:  $U = 0.00$ ,  $Z = -1.96$ ,  $p = 0.049$ ; Konzentration 3,0:  $U = 0.00$ ,  $Z = -1.96$ ,  $p = 0.049$ ; Konzentration 30,0:  $U = 0.00$ ,  $Z = -1.96$ ,  $p = 0.049$

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bereits unter Standardkulturbedingungen eine transkriptionelle Aktivität des Renin-Promoters besteht, da im Mann-Whitney-U-Test im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikante Abnahme der

Luziferase-Aktivität messbar ist. Es kann jedoch bei höheren Dexamethason-Konzentrationen nur eine Tendenz zur Abnahme der Luziferase-Aktivität festgestellt werden (Tabelle 1); Konzentration 0,3:  $U = 3.00$ ,  $Z = -0.655$ ,  $p = 0.513$ ; Konzentration 3,0:  $U = 3.00$ ,  $Z = -0.655$ ,  $p = 0.513$ ; Konzentration 30,0:  $U = 3.00$ ,  $Z = -0.655$ ,  $p = 0.513$

### 3.2 Studien zur Prorenin/Renin-Expression

Zur Untersuchung des totalen Renin-Gehalts im Zellüberstand wurde, wie bereits in Kapitel 2 beschrieben, ein ELISA durchgeführt.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Renin-Ausschüttung gemessen in optischer Dichte. Es wird deutlich, dass der Renin-Gehalt im Zellüberstand unter steigenden Dexamethason-Konzentrationen abnimmt. Es konnte auch gezeigt werden, dass die As4.1 Zellen kontinuierlich Renin sezernieren, da in der Negativkontrolle die höchsten Konzentrationen an Renin gemessen wurden.

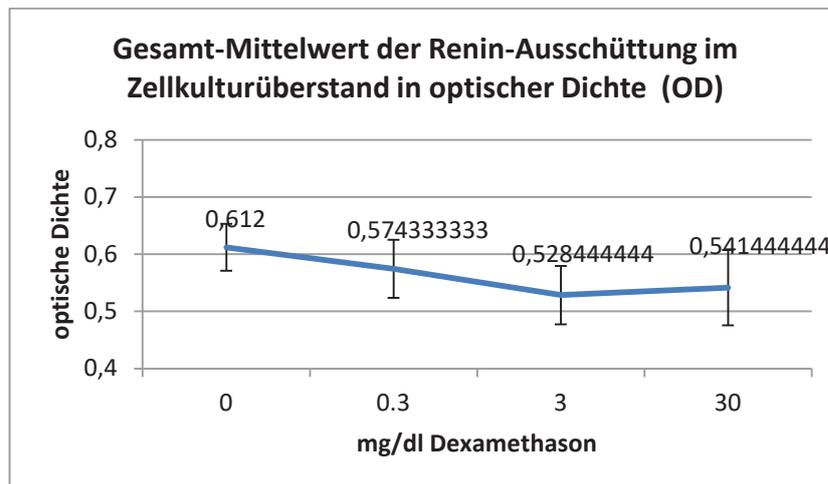


Abb. 5

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Renin-Ausschüttung im Zellkulturüberstand unter den verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen gemessen in optischer Dichte. Auf der Ordinate wurde die optische Dichte und auf der Abszisse wurden die Dexamethason-Konzentrationen in mg/dl aufgetragen. Auch hier zeigt sich eine Abnahme der Renin-Synthese unter steigenden Dexamethason-Konzentrationen.

Zur weiteren Untersuchung führten wir die statistische Auswertung mittels zweiseitigen Wilcoxon-Test durch, um die Renin-Ausschüttung bei verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen zu vergleichen. Ab einem  $p$ -Wert von  $< 0.05$  wurden die Daten als statistisch signifikant gewertet

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse für die Vergleiche zwischen den verschiedenen Konzentrationen dargestellt.

Die folgende Tabelle zeigt den Wilcoxon-Test für die Konzentrationen 0 mg/dl und 0,3 mg/dl Dexamethason. Es wurden 3 ELISAs mit jeweils 3 Proben durchgeführt, sodass sich eine „sample size“ von 9 ergibt. Im Median zeigte sich für die Konzentration 0 mg/dl eine höhere optische Dichte als für die Konzentration 0,3 mg/dl.  $p=0,0039$  und ist damit signifikant.

#### Wilcoxon-Test gepaarter Stichproben

Probe 1	0 mg Dexamethason
Probe 2	0,3 mg Dexamethason

	Probe 1	Probe 2
Probengröße	9	9
Kleinster Wert	25,2000	23,5000
Höchster Wert	20,5000	28,0000
Median	28,1000	25,7000
95 % KI für Median	25,7552 bis 28,8000	24,0380 bis 27,3310
Interquartil Abstand	26,0000 bis 28,8000	24,6500 bis 27,0250

Hodges-Lehmann mediane Differenz	-1,8000
95 % Konfidenz-Intervall	2,8000 bis 0,7500

Anzahl positiver Differenzen	0
Anzahl negativer Differenzen	9
Kleinere Summe der Ränge	0,00
Zweiseitige Wahrscheinlichkeit	$P = 0,0039$

**Tabelle 2**

Die Tabelle zeigt den Wilcoxon-Test für die Dexamethason-Konzentrationen 0 mg/dl und 0,3 mg/dl. Der Test zeigt, dass die Renin-Synthese bzw. Renin-Konzentration im Zellkulturüberstand unter Zugabe von 0,3 mg/dl Dexamethason signifikant abnimmt.

Die folgende Tabelle 3 zeigt den Wilcoxon-Test für die Konzentrationen 0 mg/dl und 3 mg/dl Dexamethason. Es wurden auch hier drei unabhängige ELISAs mit jeweils drei Proben durchgeführt, sodass sich eine „sample size“ von 9 ergibt. Im Median zeigte sich für die Konzentration 0 mg/dl eine höhere optische Dichte als für die Konzentration 3 mg/dl.  $p=0,0039$  und ist damit signifikant.

#### Wilcoxon-Test gepaarter Stichproben

Probe 1	0 mg Dexamethason
Probe 2	3 mg Dexamethason

	Probe 1	Probe 2
Probengröße	9	9
Kleinster Wert	25,2000	18,2000
Höchster Wert	30,5000	26,0000
Median	28,1000	23,8000
95 % KI für Median	25,7552 bis 28,8000	22,5380 bis 25,6930
Interquartil Abstand	26,0000 bis 28,8000	23,1500 bis 24,7750

Hodges-Lehmann mediane Differenz	-3,8500
95 % Konfidenz-Intervall	-5,7000 bis -2,5000

Anzahl positiver Differenzen	0
Anzahl negativer Differenzen	9
Kleinere Summe der Ränge	0,00
Zweiseitige Wahrscheinlichkeit	$P = 0,0039$

**Tabelle 3**

Die Tabelle zeigt den Wilcoxon-Test für die Dexamethason-Konzentrationen 0 mg/dl und 3 mg/dl. Der Test zeigt, dass die Renin-Synthese bzw. Renin-Konzentration im Zellkulturüberstand unter Zugabe von 3 mg/dl Dexamethason signifikant abnimmt.

Die Tabelle 4 zeigt den Wilcoxon-Test für die Konzentrationen 0 mg/dl und 30 mg/dl Dexamethason. Es wurden drei unabhängige ELISAs mit jeweils drei Proben durchgeführt, sodass sich eine „sample size“ von 9 ergibt. Im Median zeigte sich für die Konzentration 0 mg/dl eine höhere optische Dichte als für die Konzentration 30 mg/dl.  $p=0,039$  und ist damit signifikant.

#### Wilcoxon-Test gepaarter Stichproben

Probe 1	0 mg Dexamethason
Probe 2	30 mg Dexamethason

	Probe 1	Probe 2
Probengröße	9	9
Kleinster Wert	25,2000	18,0000
Höchster Wert	30,5000	28,4000
Median	28,1000	25,7000
95 % KI für Median	25,7552 bis 28,8000	19,5414 bis 28,2758
Interquartil Abstand	26,0000 bis 28,8000	19,7250 bis 27,7250

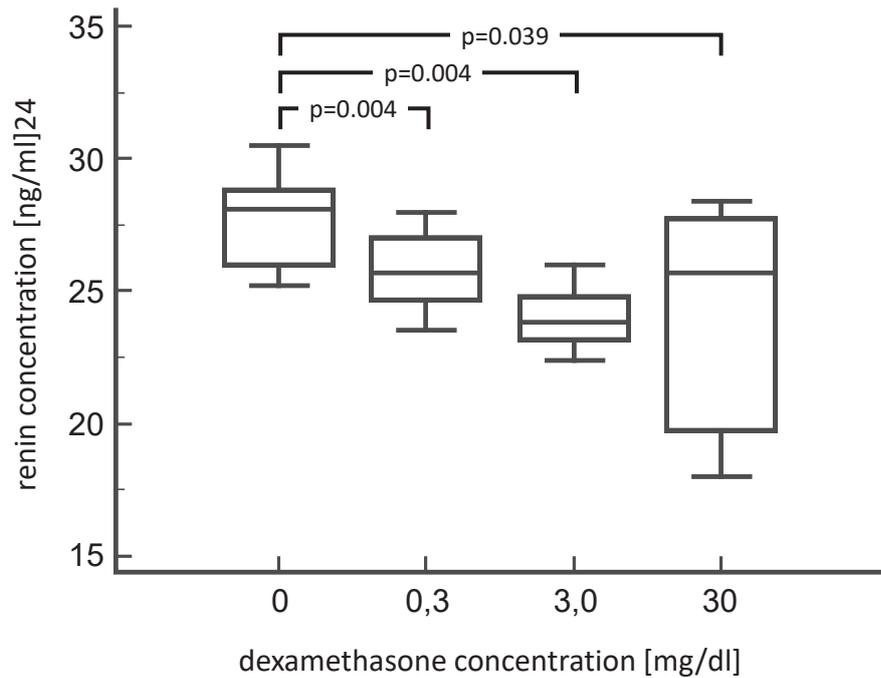
Hodges-Lehmann mediane Differenz	-3,3000
95 % Konfidenz-Intervall	-6,6000 bis -0,10000

Anzahl positiver Differenzen	1
Anzahl negativer Differenzen	8
Kleinere Summe der Ränge	5,00
Zweiseitige Wahrscheinlichkeit	$P = 0,0391$

**Tabelle 4**

Die Tabelle zeigt den Wilcoxon-Test für die Dexamethason-Konzentrationen 0 mg/dl und 30 mg/dl. Der Test zeigt, dass die Renin-Synthese bzw. Renin-Konzentration im Zellkulturüberstand unter Zugabe von 0,3 mg/dl Dexamethason signifikant abnimmt.

Mittels zweiseitigem Wilcoxon-Test konnte insgesamt gezeigt werden, dass sich die Renin-Ausschüttung im Zellkulturüberstand unter Behandlung mit den unterschiedlichen Konzentrationen an Dexamethason signifikant verändert, alle  $p < 0.05$ . Bei der bewusst gewählten  $n=3$  lassen sich aus den vorliegenden Studien jedoch keine Gesetzmäßigkeiten erkennen. Es kann postuliert werden, dass die Anwesenheit von Dexamethason zu einer Veränderung in der Sekretion von Renin führt. Es scheint, als würde Dexamethason zu einer Abnahme der Sekretion von Renin führen.



**Abb. 6**

Die Abbildung zeigt zusammenfassend die Renin-Konzentrationen in Abhängigkeit der Dexamethason-Konzentration. Sie verdeutlicht, dass unter zunehmender Dexamethason-Konzentration die Renin-Synthese signifikant abnimmt.

Insgesamt konnte mittels ELISA demonstriert werden, dass sich die Renin-Konzentration in Abhängigkeit der Dexamethason-Konzentration signifikant verringert (Abb. ).

#### 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Regulation des Renin-Gens durch Dexamethason untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob die Renin-Synthese in regelhaften Abhängigkeiten von den Glukokortikoidkonzentrationen im Serum steht. Der Hintergrund für die Untersuchung war die klinische Beobachtung, dass sich bei Patienten unter Behandlung mit Glukokortikoiden und Entwicklung einer arteriellen Hypertonie Schwierigkeiten bei der Blutdruckeinstellung ergaben und diese Patienten erhöhte Renin-Spiegel aufwiesen. Vor diesem Hintergrund wurde postuliert, dass die Renin-Synthese in einer regelhaften Abhängigkeit von den Glukokortikoidkonzentrationen im Serum steht. Weiterhin bestand die Hypothese, dass eine mäßige Erhöhung des zirkulierenden Cortisols zu einer Stimulation von Renin führe und dass eine starke Erhöhung des zirkulierenden Cortisols zu einer Suppression von Renin führe, da der mineralokortikoide Effekt den der direkten Stimulation überwiege.

Es ist eine bekannte Nebenwirkung von Glukokortikoiden, vor allem jenen mit mineralokortikoidem Effekt, dass sie zur einer sekundären Hypertonie führen können. Auch für Dexamethason konnte dieser Effekt festgestellt werden, wie Brotman et al. in einer klinischen Studie zu zeigen vermochten. Ziel dieser Arbeit war es die kurzzeitigen kardiovaskulären Effekte von Dexamethason in einer Doppelblind-Studie mit Placebo zu untersuchen. Es konnte demonstriert werden, dass Dexamethason zu einer systolischen Erhöhung des Blutdrucks führt. Als Nebeneffekte zeigten sich in dieser Studie unter anderem eine Gewichtszunahme, die Erhöhung von BNP sowie eine Abnahme von Aldosteron unter Dexamethason (Brotman et al., 2005).

Aldosteron ist ebenfalls ein in der Nebenniere gebildetes Steroidhormon, welches eine Natrium- und Wasserretention bewirkt (Löffler and Petrides, 2013). Die Feststellung der oben genannten Studie unterstützt die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass die Renin-Synthese in einer regelhaften Abhängigkeit von den Glukokortikoidkonzentrationen im Serum steht, da Angiotensin II als Produkt des RAAS zu einer Ausschüttung von Aldosteron führt.

Auch in einer weiteren Studie, diesmal jedoch an transgenen Mäusen, durchgeführt von Pandey et al., konnte gezeigt werden, dass Dexamethason-abhängig eine Hypertonie induziert werden kann. Es sind bisher im humanen Angiotensinogen-Gen Polymorphismen gefunden worden, die jeweils zwei verschiedene Haplotypen bilden. Das Allel -6A ist mit Hypertonie assoziiert, wohingegen das Allel -6G kardiovaskuläre Ereignisse zu reduzieren scheint (Jain et al., 2010). Zur weiteren Untersuchung stellte die Arbeitsgruppe um Pandey zwei Gruppen transgener Mäuse her, die jeweils mit verschiedenen Konzentrationen Dexamethason behandelt wurden. Die eine Gruppe enthielt das -6A Allel und die andere das Allel -6G. Das Ergebnis war, dass bei Vorliegen des Allel -6A des humanen Angiotensinogen-Gens Dexamethason-abhängig eine Hypertonie induziert werden kann (Pandey et al., 2015). Im Falle eines Vorliegens des

Allels -6G entwickelte sich keine Hypertonie. Es zeigte sich zudem, dass Dexamethason an das Angiotensinogen-Gen bindet und somit zu einer Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems führt.

Die Resultate von Pandey et al. kontrastieren die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass unter Stimulation mit Dexamethason eine Suppression der Renin-Synthese entsteht. Beide Arbeiten vermochten jedoch eine Abhängigkeit zwischen Dexamethason und der Renin-Synthese festzustellen.

Liu et al. führten ebenso eine Studie an transgenen Ratten durch. Sie untersuchten die Diurese sowie die Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems unter Dexamethason-Behandlung. Die Studie wurde an Ratten mit Herzinsuffizienz, an dehydrierten Ratten sowie an Ratten mit Herzinsuffizienz und Volumen-Substitution durchgeführt. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass Glukokortikoide zu einer vermehrten Diurese führen, ohne das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zu stimulieren (Liu et al., 2016). Sie postulierten zudem, dass das RAAS durch die Glukokortikoide inhibiert wird (Liu et al., 2016). Diese Hypothese stützt die in dieser Arbeit gemachte Hypothese, dass Glukokortikoide in höheren Konzentrationen zu einer Suppression von Renin führen.

In einer weiteren Studie wurde entdeckt, dass Glukokortikoide das lokale RAAS im Knochen zu aktivieren scheinen (Yongtao et al., 2014). Die Arbeitsgruppe Yongtao et al. behandelten Kaninchen mit NaCl, Dexamethason oder Dexamethason in Kombination mit Perindopril, einem ACE-Hemmer. Im Anschluss wurden die Aktivität der verschiedenen RAAS-Komponenten sowie der Knochenmetabolismus untersucht. Die Studien ergaben, dass das lokale RAAS des Knochens eine Rolle in Glukokortikoid-induzierter Osteoporose zu spielen scheint und es wird postuliert, dass eine Blockierung des lokalen RAAS eine Besserung der Glukokortikoid-induzierten Osteoporose bringt (Yongtao et al., 2014).

Kürzlich wurde in einer Studie der Zusammenhang zwischen der Katecholamin-Sekretion und der Aktivierung des RAAS bei Patienten mit Phäochromozytom untersucht (Haase et al., 2017). Die Datenlage zeigte sich in der Studie jedoch nicht eindeutig. Hintergrund für diese Studie war, dass Katecholamine an  $\beta$ 1-Rezeptoren binden und darüber eine Sekretion von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen bewirken (STOICESCU et al.). In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass intraadrenales Cortisol für die Katecholaminsynthese nötig ist (Hodel, 2001). Auch in anderen Arbeiten wurde deutlich, dass bei niedrigen Cortisolspiegeln auch die Katecholaminspiegel niedrig bleiben (Merke et al., 2000). Somit wäre dies ein weiterer Ansatz die in dieser Arbeit entstandenen Daten zu erklären.

Insgesamt kann anhand aktueller Studienlagen festgestellt werden, dass eine regelhafte Abhängigkeit zwischen Glukokortikoiden und des Renin-Angiotensin-Systems existiert. Wie die genauen Abhängigkeiten bestehen und deren genauer Mechanismus, bleibt in weiteren Studien zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Zellebene die in Absatz 1 dieses Kapitels dargelegte Hypothese untersucht. Die hier verwendete Zelllinie As4.1 entstammt dem renalen Tumor einer transgenen Maus, die in der Lage ist durch den Ren1c-Locus hohe Mengen an Renin-mRNA zu produzieren. Die Zellen ähneln stark den juxtaglomerulären Zellen der Niere (Sigmund et al., 1990b). Es existiert auch eine menschliche Zelllinie, die Calu-6 Zelllinie, die Renin-mRNA produzieren. Es handelt sich um Renin-produzierende Zellen eines pulmonalen Karzinoms (Germain et al., 1997). Der Vorteil der in der As4.1 Zelllinie liegt ist, dass die Zellen der Niere entstammen und somit ein hervorragendes Modell für Studien des RAAS darstellen und dass sie über längere Zeiträume konstante Mengen an Renin ausschütten.

Es zeigte sich in dieser Arbeit auf Promoter-Ebene, dass bereits unter Standardkulturbedingungen eine transkriptionelle Aktivität des Renin-Promoters besteht. Diese nahm jedoch bei höheren Konzentrationen an Dexamethason ab, sodass postuliert werden kann, dass Dexamethason in hohen Konzentrationen den Renin-Promoter inhibiert, was der Arbeitshypothese entspricht. Was nicht nachgewiesen werden konnte, ist, dass bei geringeren Konzentrationen eine Stimulation der Ausschüttung von Renin besteht. Eine Tendenz zur Abnahme der Promoter-Aktivität zeigte sich bei allen Dexamethason-Konzentrationen. Es kann diskutiert werden, weitere Stimulationsversuche mit einer höheren Variation an Konzentrationen Dexamethason vorzunehmen. Bei höheren Konzentrations-Variationen würde womöglich die Arbeitshypothese bestätigt werden und es könnte gegebenenfalls herausgearbeitet werden, dass unter bestimmten Konzentrationen eine Stimulation der Ausschüttung von Renin besteht.

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass Dexamethason an den Promoter bindet, sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob Dexamethason lediglich an den Promoter bindet, oder ob sich weitere Effekte auf die Renin-Synthese ergeben. Auf Protein-Ebene vermochte mittels ELISA gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Abnahme der Renin-Ausschüttung unter Stimulation mit den verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen kam. Diese Beobachtung stimmt mit der Untersuchung auf Promoter-Ebene überein. Diese Ergebnisse der Studien suggerieren, dass Dexamethason ein Inhibitor des Renin-Gens ist. In einer zuvor in diesem Kapitel zitierten Studie an Ratten konnte dieser inhibitorische Effekt von Dexamethason ebenso gezeigt werden (Liu et al., 2016).

Dexamethason als synthetisches Glukokortikoid wurde als Vertreter für Glukokortikoide gewählt, da es keine mineralokortikoiden Effekte besitzt. Die natürlichen Glukokortikoide besitzen mineralokortikoiden Effekte und damit Auswirkungen auf den Elektrolyt-Haushalt im Sinne einer Natrium- und Wasserretention (Löffler and Petrides, 2013). Diesen Effekt galt es so gering wie möglich zu halten. Auch aufgrund der langen Wirkdauer war es für die durchgeführten Studien gut geeignet (Karow, 2016). Bei den gewählten Konzentrationen handelt es

sich um bereits in weiteren Studien erprobten sowie in der Klinik gebräuchlichen Konzentrationen (Brotman et al., 2005; Karow, 2016).

Kritisch zu beachten gilt es, dass in den durchgeführten Studien eine Stichprobe mit  $n = 3$  vorliegt. Die Größe der Stichprobe wurde als hinreichend befunden, um die Möglichkeit des genannten Zusammenhangs zwischen Renin-Synthese und Glukokortikoidkonzentration zu überprüfen. Da die Ergebnisse der ELISA-Studien signifikant sind, ist der gezeigte Zusammenhang in Folgestudien genauer zu definieren. Eine Verwendung größerer Stichproben in Folgestudien könnte in einem positiven Falle eine höhere Power/Teststärke ergeben. Eine höhere Power erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die Hypothese der Arbeit positiv ist. Höhere Power erreicht man durch Vergrößerung des Stichprobenumfangs (Timischl, 2013). Dies würde auch zu einem höheren Signifikanzniveau führen, das heißt, die Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese fälschlicherweise zu verwerfen (Fehler erster Art) wäre höher (Timischl, 2013). Eine Reduktion des Signifikanzniveaus wiederum würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, die Nullhypothese nicht zu verwerfen, obwohl diese falsch ist.

Es wird anhand der durchgeführten Untersuchungen deutlich, dass Dexamethason an Bindungsstellen des Renin-Promoters bindet. Man kann vor dem Hintergrund der verschiedenen Studien in der vorliegenden Arbeit, aber auch in den zitierten Publikationen diskutieren, dass es womöglich verschiedene Bindungsstellen gibt, die inhibitorisch oder aktivierend wirken. So kann festgestellt werden, dass Dexamethason unter bestimmten Bedingungen, zu einer Inhibition des RAAS-Systems führt (Liu et al., 2016). Zudem wurde in der Publikation von Pandey et al. deutlich, dass die Entwicklung einer hypertensiven Erkrankung unter Behandlung mit Glukokortikoiden auch eine genetische Abhängigkeit hat, nämlich dem Vorliegen des Allels -6A.

Eine weitere Ergänzung dieser Arbeit wäre eine Studie auf mRNA-Ebene und damit die Durchführung einer Polymeraseketten-Reaktion (PCR). Dies könnte die hier durchgeführten Studien weiter untermauern und würde weitere Aufschlüsse über die genauen Regulations-Mechanismen der Interaktion zwischen Dexamethason und der Renin-Synthese geben.

Abschließend lässt sich die im Kapitel „Ziel der Arbeit“ dargestellte Hypothese nicht bestätigen. Es vermochte vor allem im ELISA gezeigt zu werden, dass Dexamethason einen inhibitorischen Effekt auf die Renin-Expression zu haben scheint. Weitere Folgestudien könnten diesen Effekt durch beispielsweise Vergrößerung der Stichprobe untermauern. Anhand der aktuellen Studienlage zeigt sich, dass die Interaktion zwischen Glukokortikoiden und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ein Themengebiet darstellen, was es wert ist weiter erforscht zu werden. Liu et al. zeigten, mit ihrer klinisch ausgerichteten Arbeit, die Relevanz dieses Themas im Bereich der Kardiologie. Es zeigt sich jedoch auch in der Orthopädie bedeutsam, da das lokale RAAS einen Effekt auf die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose zu haben scheint (Yongtao

et al., 2014). Diese sekundäre Form der Osteoporose stellt ein nicht zu unterschätzendes Problem dar, da 30 % der Patienten, die über einen Zeitraum von 5 Jahren mit Glukokortikoiden behandelt werden, eine Fraktur erleiden (Reid, 1997).

Es sollte, in Zusammenschau der aktuellen Datenlage, Gegenstand weiterer Studien sein, die genauen Mechanismen der Regulation des Renin-Gens durch Dexamethason zu erforschen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Bader, M. (2010). Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone Systems: Targets for Pharmacological Therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *50*, 439–465.
- Baumann, H., Wang, Y., Richards, C.D., Jones, C.A., Black, T.A., and Gross, K.W. (2000). Endotoxin-induced Renal Inflammatory Response ONCOSTATIN M AS A MAJOR MEDIATOR OF SUPPRESSED RENIN EXPRESSION. *J. Biol. Chem.* *275*, 22014–22019.
- Borensztein, P., Germain, S., Fuchs, S., Philippe, J., Corvol, P., and Pinet, F. (1994). cis-regulatory elements and trans-acting factors directing basal and cAMP-stimulated human renin gene expression in chorionic cells. *Circ. Res.* *74*, 764–773.
- Brotman, D.J., Girod, J.P., Garcia, M.J., Patel, J.V., Gupta, M., Posch, A., Saunders, S., Lip, G.Y.H., Worley, S., and Reddy, S. (2005). Effects of Short-Term Glucocorticoids on Cardiovascular Biomarkers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 3202–3208.
- Burt, D.W., Nakamura, N., Kelley, P., and Dzau, V.J. (1989). Identification of negative and positive regulatory elements in the human renin gene. *J. Biol. Chem.* *264*, 7357–7362.
- Cassis, L.A., Police, S.B., Yiannikouris, F., and Thatcher, S.E. (2008). Local Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. *Curr. Hypertens. Rep.* *10*, 93–98.
- Cheng, Q., and Leung, P.S. (2011). An update on the islet renin–angiotensin system. *Peptides* *32*, 1087–1095.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., et al. (2000). A Novel Angiotensin-Converting Enzyme–Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. *Circ. Res.* *87*, e1–e9.
- Engeli, S., Böhnke, J., Gorzelniak, K., Janke, J., Schling, P., Bader, M., Luft, F.C., and Sharma, A.M. (2005). Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension* *45*, 356–362.
- Germain, S., Philippe, J., Fuchs, S., Lengronne, A., Corvol, P., and Pinet, F. (1997). Regulation of human renin secretion and gene transcription in Calu-6 cells. *FEBS Lett.* *407*, 177–183.
- Giani, J.F., Janjulia, T., Kamat, N., Seth, D.M., Blackwell, W.-L.B., Shah, K.H., Shen, X.Z., Fuchs, S., Delpire, E., Toblli, J.E., et al. (2014). Renal Angiotensin-Converting Enzyme Is Essential for the Hypertension Induced by Nitric Oxide Synthesis Inhibition. *J. Am. Soc. Nephrol.* *25*, 2752–2763.
- Glenn, S.T., Jones, C.A., Gross, K.W., and Pan, L. (2013). Control of Renin Gene Expression. *Pflugers Arch.* *465*, 13–21.
- Greer, L.F., and Szalay, A.A. (2002). Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* *17*, 43–74.

- Haase, M., Dringenberg, T., Allelein, S., Willenberg, H., and Schott, M. (2017). Excessive Catecholamine Secretion and the Activation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone-System in Patients with Pheochromocytoma: A Single Center Experience and Overview of the Literature. *Horm. Metab. Res.* *49*, 748–754.
- Hodel, A. (2001). Effects of Glucocorticoids on Adrenal Chromaffin Cells. *J. Neuroendocrinol.* *13*, 216–220.
- Jain, S., Tillinger, A., Mopidevi, B., Pandey, V.G., Chauhan, C.K., Fiering, S.N., Warming, S., and Kumar, A. (2010). Transgenic Mice with –6A Haplotype of the Human Angiotensinogen Gene Have Increased Blood Pressure Compared with –6G Haplotype. *J. Biol. Chem.* *285*, 41172–41186.
- Kang, N., Walther, T., Tian, X.-L., Bohlender, J., Fukamizu, A., Ganten, D., and Bader, M. (2002). Reduced hypertension-induced end-organ damage in mice lacking cardiac and renal angiotensinogen synthesis. *J. Mol. Med.* *80*, 359–366.
- Karow, T. (2016). *Pharmakologie Thomas Karow 2018* (Karow).
- Klar, J., Vitzthum, H., and Kurtz, A. (2004). Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* *286*, F349–F355.
- Klar, J., Sigl, M., Obermayer, B., Schweda, F., Krämer, B.K., and Kurtz, A. (2005). Calcium Inhibits Renin Gene Expression by Transcriptional and Posttranscriptional Mechanisms. *Hypertension* *46*, 1340–1346.
- Lang, J.A., Yang, G., Kern, J.A., and Sigmund, C.D. (1995). Endogenous Human Renin Expression and Promoter Activity in CALU-6, a Pulmonary Carcinoma Cell Line. *Hypertension* *25*, 704–710.
- Lavoie, J.L., and Sigmund, C.D. (2003). Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology* *144*, 2179–2183.
- Liu, C., Ge, N., Zhai, J.-L., and Zhang, J.-X. (2016). Dexamethasone-induced diuresis is associated with inhibition of the renin–angiotensin–aldosterone system in rats. *Kaohsiung J. Med. Sci.* *32*, 614–619.
- Liu, X., Huang, X., and Sigmund, C.D. (2003). Identification of a Nuclear Orphan Receptor (Ear2) as a Negative Regulator of Renin Gene Transcription. *Circ. Res.* *92*, 1033–1040.
- Löffler, G., and Petrides, P.E. (2013). *Biochemie und Pathobiochemie* (Springer-Verlag).
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., and Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator: Immunologie* (Springer-Verlag).
- Matsushita, K., Morello, F., Wu, Y., Zhang, L., Iwanaga, S., Pratt, R.E., and Dzau, V.J. (2010). Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Renin-producing Juxtaglomerular (JG)-like Cells under the Control of Liver X Receptor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* *285*, 11974–11982.

- Merke, D.P., Chrousos, G.P., Eisenhofer, G., Weise, M., Keil, M.F., Rogol, A.D., Van, J.W., and Bornstein, S.R. (2000). Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1362–1368.
- Morello, F., de Boer, R.A., Steffensen, K.R., Gnechi, M., Chisholm, J.W., Boomsma, F., Anderson, L.M., Lawn, R.M., Gustafsson, J.-Å., Lopez-Illasaca, M., et al. (2005). Liver X receptors  $\alpha$  and  $\beta$  regulate renin expression in vivo. *J. Clin. Invest.* *115*, 1913–1922.
- Murakami, K., Wada, J., Ogawa, D., Horiguchi, C.S., Miyoshi, T., Sasaki, M., Uchida, H.A., Nakamura, Y., and Makino, H. (2013). The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab. Vasc. Dis. Res.* *10*, 93–96.
- Pan, L., and Gross, K.W. (2005). Transcriptional Regulation of Renin An Update. *Hypertension* *45*, 3–8.
- Pan, L., Black, T.A., Shi, Q., Jones, C.A., Petrovic, N., Loudon, J., Kane, C., Sigmund, C.D., and Gross, K.W. (2001). Critical Roles of a Cyclic AMP Responsive Element and an E-box in Regulation of Mouse Renin Gene Expression. *J. Biol. Chem.* *276*, 45530–45538.
- Pan, L., Glenn, S.T., Jones, C.A., Gronostajski, R.M., and Gross, K.W. (2003). Regulation of renin enhancer activity by nuclear factor I and Sp1/Sp3. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* *1625*, 280–290.
- Pan, L., Jones, C.A., Glenn, S.T., and Gross, K.W. (2004). Identification of a novel region in the proximal promoter of the mouse renin gene critical for expression. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* *286*, F1107–F1115.
- Pandey, V.G., Jain, S., Rana, A., Puri, N., Arudra, S.K.C., Mopidevi, B., Kaw, M., Nasjletti, A., and Kumar, A. (2015). Dexamethasone Promotes Hypertension by Allele-specific Regulation of the Human Angiotensinogen Gene. *J. Biol. Chem.* *290*, 5749–5758.
- Pape, H.-C., Kurtz, A., and Silbernagel, S. (2014). *Physiologie* (Georg Thieme Verlag).
- Peng, H., Li, W., Seth, D.M., Nair, A.R., Francis, J., and Feng, Y. (2013). (Pro)renin Receptor Mediates Both Angiotensin II-Dependent and -Independent Oxidative Stress in Neuronal Cells. *PLOS ONE* *8*, e58339.
- Petrovic, N., Black, T.A., Fabian, J.R., Kane, C., Jones, C.A., Loudon, J.A., Abonia, J.P., Sigmund, C.D., and Gross, K.W. (1996). Role of Proximal Promoter Elements in Regulation of Renin Gene Transcription. *J. Biol. Chem.* *271*, 22499–22505.
- Petrovic, N., Kane, C.M., Sigmund, C.D., and Gross, K.W. (1997). Downregulation of Renin Gene Expression by Interleukin-1. *Hypertension* *30*, 230–235.
- Reid, I.R. (1997). Glucocorticoid osteoporosis--mechanisms and management. *Eur. J. Endocrinol.* *137*, 209–217.

- Reis, F.M., Bouissou, D.R., Pereira, V.M., Camargos, A.F., dos Reis, A.M., and Santos, R.A. (2011). Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. *Fertil. Steril.* *95*, 176–181.
- Ryan, M.J., Black, T.A., Gross, K.W., and Hajduczuk, G. (2000). Cyclic mechanical distension regulates renin gene transcription in As4.1 cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *279*, E830–E837.
- Santos, R.A.S., e Silva, A.C.S., Maric, C., Silva, D.M.R., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V.B., Lopes, M.T., Bader, M., et al. (2003). Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8258–8263.
- Shanmugam, S., Corvol, P., and Gasc, J.M. (1994). Ontogeny of the two angiotensin II type 1 receptor subtypes in rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *267*, E828–E836.
- Sherf, B.A., Navarro, S.L., Hannah, R.R., and Wood, K.V. (1996). Dual-Luciferase<sup>®</sup> reporter assay: An advanced co-reporter technology integrating firefly and Renilla luciferase assays. *Promega Notes* *57*.
- Shi, Q., Black, T.A., Gross, K.W., and Sigmund, C.D. (1999). Species-Specific Differences in Positive and Negative Regulatory Elements in the Renin Gene Enhancer. *Circ. Res.* *85*, 479–488.
- Shi, Q., Gross, K.W., and Sigmund, C.D. (2001). Retinoic Acid-mediated Activation of the Mouse Renin Enhancer. *J. Biol. Chem.* *276*, 3597–3603.
- Sigmund, C.D., and Gross, K.W. (1991). Structure, expression, and regulation of the murine renin genes. *Hypertension* *18*, 446–457.
- Sigmund, C.D., Okuyama, K., Ingelfinger, J., Jones, C.A., Mullins, J.J., Kane, C., Kim, U., Wu, C.Z., Kenny, L., and Rustum, Y. (1990a). Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J. Biol. Chem.* *265*, 19916–19922.
- Steege, A., Föhling, M., Paliege, A., Bondke, A., Kirschner, K.M., Martinka, P., Kaps, C., Patzak, A., Persson, P.B., Thiele, B.J., et al. (2008). Wilms' tumor protein ([minus]KTS) modulates renin gene transcription. *Kidney Int.* *74*, 458–466.
- STOICESCU, M., CSEPENTO, C., MU, G., and BUNG, S. The role of increased plasmatic renin level in the pathogenesis of arterial hypertension in young adults. *5*.
- Tamura, K., Umemura, S., Nyui, N., Yamaguchi, S., Ishigami, T., Hibi, K., Yabana, M., Kihara, M., Fukamizu, A., Murakami, K., et al. (1997). A Novel Proximal Element Mediates the Regulation of Mouse Ren-1C Promoter by Retinoblastoma Protein in Cultured Cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 16845–16851.
- Tanimoto, K., Sugiura, A., Kanafusa, S., Saito, T., Masui, N., Yanai, K., and Fukamizu, A. (2008). A single nucleotide mutation in the mouse renin promoter disrupts blood pressure regulation. *J. Clin. Invest.* *118*, 1006–1016.

Timischl, W. (2013). *Angewandte Statistik: Eine Einführung für Biologen und Mediziner* (Springer-Verlag).

Todorov, V.T., Völkl, S., Müller, M., Bohla, A., Klar, J., Kunz-Schughart, L.A., Hehlhans, T., and Kurtz, A. (2004). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Activates NF $\kappa$ B to Inhibit Renin Transcription by Targeting cAMP-responsive Element. *J. Biol. Chem.* 279, 1458–1467.

Todorov, V.T., Völkl, S., Friedrich, J., Kunz-Schughart, L.A., Hehlhans, T., Vermeulen, L., Haegeman, G., Schmitz, M.L., and Kurtz, A. (2005). Role of CREB1 and NF $\kappa$ B-p65 in the Down-regulation of Renin Gene Expression by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 280, 24356–24362.

Todorov, V.T., Desch, M., Schmitt-Nilson, N., Todorova, A., and Kurtz, A. (2007). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Is Involved in the Control of Renin Gene Expression. *Hypertension* 50, 939–944.

Todorov, V.T., Desch, M., Schubert, T., and Kurtz, A. (2008). The Pal3 Promoter Sequence Is Critical for the Regulation of Human Renin Gene Transcription by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ . *Endocrinology* 149, 4647–4657.

Weatherford, E.T., Liu, X., and Sigmund, C.D. (2012). Regulation of renin expression by the orphan nuclear receptors Nr2f2 and Nr2f6. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 302, F1025–F1033.

Ying, L., Morris, B.J., and Sigmund, C.D. (1997). Transactivation of the Human Renin Promoter by the Cyclic AMP/Protein Kinase A Pathway Is Mediated by Both cAMP-responsive Element Binding Protein-1 (CREB)-dependent and CREB-independent Mechanisms in Calu-6 Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 2412–2420.

Yongtao, Z., Kunzheng, W., Jingjing, Z., Hu, S., Jianqiang, K., Ruiyu, L., and Chunsheng, W. (2014). Glucocorticoids activate the local renin-angiotensin system in bone: possible mechanism for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrine* 47, 598–608.

Yuan, W., Pan, W., Kong, J., Zheng, W., Szeto, F.L., Wong, K.E., Cohen, R., Klopot, A., Zhang, Z., and Li, Y.C. (2007). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Suppresses Renin Gene Transcription by Blocking the Activity of the Cyclic AMP Response Element in the Renin Gene Promoter. *J. Biol. Chem.* 282, 29821–29830.

Zhong, J., Basu, R., Guo, D., Chow, F.L., Byrns, S., Schuster, M., Loibner, H., Wang, X., Penninger, J.M., Kassiri, Z., et al. (2010). Angiotensin-converting enzyme 2 suppresses pathological hypertrophy, myocardial fibrosis, and cardiac dysfunction. *Circulation* 122, 717–728, 18 p following 728.

<http://www.promega.com/products/reporter-assays-and-transfection/reporter-vectors-and-cell-lines/pgl2-luciferase-reporter-vectors/>

<https://www.promega.com/resources/vector-sequences/discontinued-vectors/>

<http://www.promega.com/products/reporter-assays-and-transfection/reporter-vectors-and-cell-lines/prl-renilla-luciferase-control-reporter-vectors/>

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plasmidkarte des pGEM-2 Vektors.....	9
Abbildung 2: Plasmidkarte des pGL2-Basic Vektors .....	10
Abbildung 3: Plasmidkarte des pRL-TK Vektors.....	10
Abbildung 4: Luziferase-Aktivität.....	15
Abbildung 5: Mittelwerte der Renin-Ausschüttung unter den verschiedenen Dexamethason-Konzentrationen im ELISA.....	17
Abbildung 6: Renin-Konzentrationen in Abhängigkeit der Dexamethason-Konzentration im ELISA.....	21

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen für die verschiedenen Bedingungen im Reporter-Gen-Assay.....	16
Tabelle 2: Wilcoxon-Test für die Dexamethason-Konzentrationen 0mg/dl und 0,3mg/dl im ELISA.....	18
Tabelle 3: Wilcoxon-Test für die Dexamethason-Konzentrationen 0mg/dl und 3mg/dl im ELISA.....	19
Tabelle 4: Wilcoxon-Test für die Dexamethason-Konzentrationen 0mg/dl und 30mg/dl im ELISA.....	20

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. H. S. Willenberg möchte ich zu allererst für die Bereitstellung dieses Themas und seine fortwährende Betreuung und Unterstützung danken.

Herrn Prof. Dr. med. M. Schott danke ich für das Anvertrauen des Themas.

Zudem möchte ich mich bei allen – auch ehemaligen – Mitarbeitern des endokrinologischen Forschungslabors bedanken, die mich stets in jeglicher hilfsbereiter Art unterstützten.

Ein großer Dank gilt auch Herrn PhD Curt D. Sigmund von der University of Iowa ohne dessen Plasmid die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich stets unterstützt haben, mir Verständnis entgegenbrachten, und immer ein aufmunterndes Wort übrig hatten.

Zuletzt möchte ich an meinen Großvater erinnern, dessen weise Worte mich immer begleiten.