

# Stimuliert die Überexpression von Renin „Prosurvival-Signalkaskaden“ in H9c2 Kardiomyoblasten?

Jonathan Bennewitz

Betreuer: Prof. Dr. J. Peters

Institut für Physiology, Universitätsmedizin Greifswald

## Hintergrund

Neben dem klassischen Renin als Bestandteil des Renin-Angiotensin Systems, wurde eine zytosolische Renin-Isoform identifiziert (zyto-Renin)<sup>1</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von cyto-renin protektive Effekte auslöst. So kommt es in H9c2 Kardiomyoblasten zu einer Reduktion der Nekrose rate (Abb. 1A)<sup>2</sup>, während sekretorisches Renin die Nekrose rate erhöht. Darüber hinaus kommt es zu einer Aufhebung des Anstiegs der Apoptose rate durch Glukosedepletion und Hypoxie (Abb. 1B). Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob die Überexpression des cyto-renins einen fördernden Einfluss auf anti-apoptische und pro-survival Signalkaskaden (Abb. 2) hat. Dies könnte unter Umständen dann die kardioprotektiven Effekte des cyto-renins erklären.

<sup>1</sup>: Clausmeyer et al. (1999), Circ Res; 84:337-344 <sup>2</sup>: Wanka et al. (2009). J. Cell. Mol. Med. 13(9A) : 2926-2937

Abb. 1 : Anti-nekrotische und Anti-apoptotische Wirkung von zytosolischem Renin

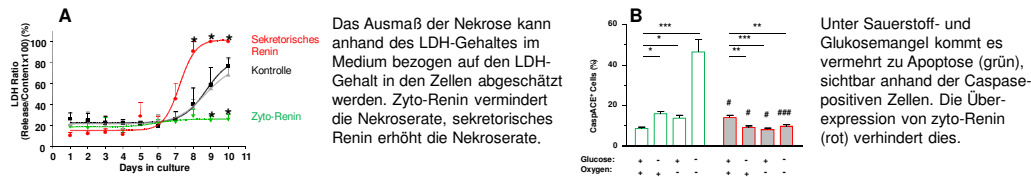
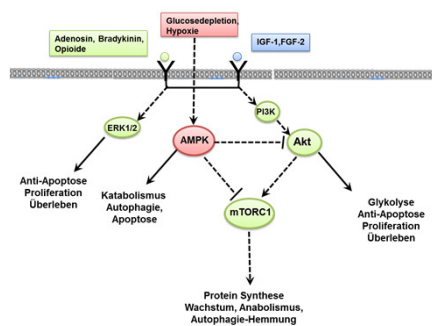
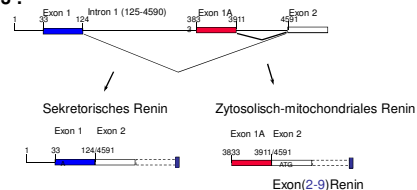


Abb. 2 : Prosurvival-Signalkaskaden



## Methoden

Abb. 3 :



### RT-PCR (Taqman Analysen) zur mRNA-Quantifizierung:

Im Rahmen der Untersuchung wurden pIRES Vektor-transfizierte H9c2 Kardiomyoblasten verwendet, welche die verschiedenen Transkripte des Renins unter Kontrolle des Cytomegaloviruspromotors überexprimieren: H9c2-pIRES (Leervektor), H9c2-D36 [zytosoisches Exon(2-9)Renin], H9c2-RenG [zytosoisches Exon(1A-9)Renin] H9c2-PP8 [sekretorisches Exon(1-9) Renin] (Abb. 3). Ein Nachweis der Überexpression erfolgte durch q-RT-PCR-Experimente (Daten nicht gezeigt).

**Westernblot:** transfizierte Zellen wurden für 3 Tage kultiviert und danach lysiert. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Cellulose-Membran transferiert. Es erfolgte dann eine Inkubation mit den primären Antikörpern gegen die Kinasen AMPK, Akt und mTOR und deren jeweilige aktive (phosphorylierte) Variante (p-AMPK, p-Akt(S473), p-mTOR(S2448)). Die Antikörperbindung wurde durch einen sekundären Antikörper nachgewiesen, der chemilumineszierend ist, sodass die Signalstärke ausgewertet werden konnte. Die Ratio der phosphorylierten Form zum Gesamtprotein (Abb. 4-6 A) dient als Maß für die Aktivität des jeweiligen Faktors in den Zellen, die Ratio der phosphorylierten- zur unphosphorylierten Variante zeigt das Ausmaß der Konversion von inaktiver zu aktiver Form an (Abb. 4-6 C).

**Statistik:** mean ±SEM, t-test oder one way ANOVA für jeweils 6 Versuche.

## Ergebnisse

### Die Überexpression des zytosolischen Renins stimuliert Prosurvival-Signalkaskaden in H9c2-Zellen

- Die Überexpression von zytosolischem Renin hatte keinen Einfluss auf AMPK (Abb. 4). Die Überexpression des sekretorisches Renin erhöhte zwar die Ratio von phosphoryliertem zu gesamtem AMPK (Abb. 4C), führte aber nicht zu einen absoluten Anstieg der phosphorylierten Versionen (vgl. Abb. 4 A). Gesamt AMPK war hier sogar erniedrigt (Abb. 4B).
- Der Akt-pathway wird durch zytosolisches Renin deutlich-, durch sekretorisches Renin hingegen nicht stimuliert (Abb. 5 A). Sekretorisches Renin fördert die Konversion von inaktivem zu aktivem Akt geringgradig, cyto-Renin hingegen deutlich (Abb. 5 C)
- Der mTOR pathway wird ausschließlich durch zytosolisches Renin stimuliert (Abb. 6 A,C).

Abb. 4 : Proteinexpression und Phosphorylierung von AMPK in Abhängigkeit von Renin

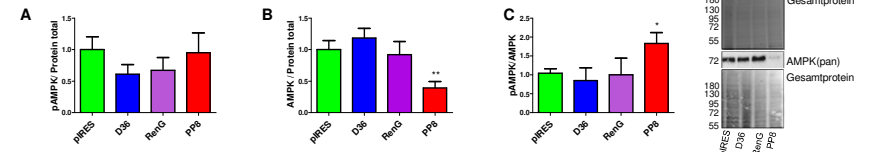


Abb. 5 : Proteinexpression und Phosphorylierung von Akt in Abhängigkeit von Renin

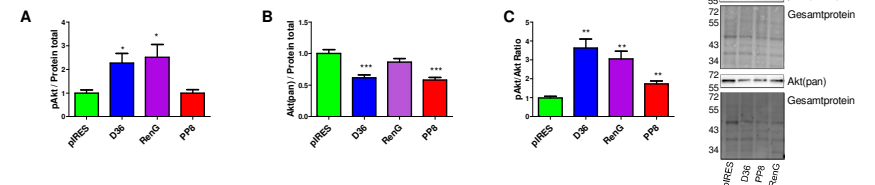
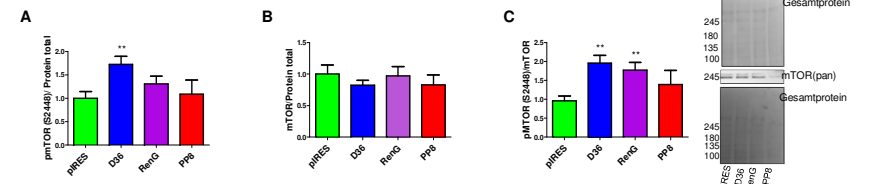


Abb. 6 : Proteinexpression und Phosphorylierung von mTOR in Abhängigkeit von Renin



### Abb. 4-6: Einfluss der Renin-Überexpression auf den Phosphorylierungsstatus verschiedener Kinasen in H9c2-Zellen

(A) p-Akt (S473), p-AMPK, p-mTOR(S2448) bezogen auf Gesamtprotein; (B) total-Akt, total-AMPK, total-mTOR bezogen auf Gesamtprotein, (C) relative Expression von p-Akt (S473) zu total-Akt, p-AMPK zu total-AMPK und p-mTOR(S2448) zu mTOR, (D) Exemplarische Westernblot-Analysen; Mittelwert ± SEM; n=6. Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels One-Way-ANOVA mit \* p ≤ 0,05; \*\*p 0,01; \*\*\*\*p 0,001.

## Schlussfolgerung

Die hier gezeigte Stimulation der Prosurvival-Signalkaskaden (Akt, mTOR) könnte an den bekannten kardioprotektiven Effekten des zytosolischen Renins beteiligt sein

- Durch eine erhöhte Aktivität von mTOR und Akt durch cyto-renin könnten anti-apoptische Signalkaskaden in Gang gesetzt werden, die den pro-apoptischen Effekt einer Glukosedepletion (s. Abb. 1B) entgegenwirken.
- Eine erhöhte Aktivität von Akt und mTOR fördert die Energiegewinnung durch aerobe Glykolyse und könnte die verminderte Nekrose rate bei H9c2-Zellen erklären, welche zytosolisches Renin überexprimieren (s. Abb. 1A)
- Eine Aktivierung von AMPK durch sekretorisches Renin könnte zu einen verstärkten Zelluntergang (s. Abb. 1A) beitragen.