Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor Prof. Dr. Michael Gekle)

Charakterisierung des Mineralokortikoid-Responsiven Elements im EGFR-Promotor

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kay Trenkmann
geboren am 17.08.1984 in Berlin

Gutachter:
1. Prof. Dr. med. Michael Gekle
2. Prof. Dr. rer. nat. Andreas Simm
3. Prof. C.A. Wagner (Universität Zürich)

Öffentliche Verteidigung am 23.10.2013

Nach der klassischen Wirkung des MR (Mineralokortikoidrezeptors) auf die Wasser- und Salzhomöostase wurde u.a. durch zwei klinische Studien, RALES - (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) und EPHESUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*), auch seine pathologische Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System offenkundig. Neben einer Vielzahl von weiteren Faktoren wurde die Interaktion mit dem EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) postuliert. Eine Steigerung der EGFR Expression durch Aldosteron konnte nachgewiesen werden. Glukokortikoide zeigen diesen Effekt nicht. Ein GRE (*Glucocorticoid Response Element*) ist im Promotor des EGFR nicht vorhanden. Zur Identifizierung des Mineralokortikoid-spezifischen HRE (*Hormone Response Element*) wurden mit Promotorkonstrukten *Reporter Gene Assays* durchgeführt. Funktionelle MREs (*Mineralocorticoid Response Elements*) konnten somit auf zwei Promotorkonstrukte eingegrenzt werden. Eine vergleichende Analyse der DNS der beiden Promotorkonstrukte identifizierte eine 15 Basenpaare umfassende Sequenz, welche sich nur um zwei Basen voneinander unterscheidet. Diese Sequenz stellt möglicherweise ein funktionelles MRE dar. Sie konnte mit geringen Abweichungen im ebenfalls Mineralokortikoid-spezifischen Gen NDRG2 nachgewiesen werden.

Trenkmann, Kay: Charakterisierung des Mineralokortikoid-Responsiven Elements im EGFR-Promotor
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

1.	**Einleitung**	1
1.1	Der Mineralokortikoidrezeptor	1
1.1.1	Gen	1
1.1.2	Protein	2
1.1.3	Koaktivatoren und –repressoren	4
1.1.4	Liganden am Mineralokortikoidrezeptor und Mineralokortikoidrezeptor -Spezifität	4
1.1.5	Signaltransduktion und allgemeine Wirkung	7
1.1.6	Epitheliale genomische Wirkung	7
1.1.7	Nicht-epitheliale Wirkung	9
1.1.8	Nicht-genotrope Wirkung	11
1.2	Der Epidermal Growth Factor Receptor	12
1.2.1	Gen	12
1.2.2	Protein	12
1.2.3	Liganden am Epidermal Growth Factor Receptor	12
1.2.4	Aktivierung, Signaltransduktion und Transaktivierung	13
1.3	Zielsetzung	16
2.	**Material und Methoden**	18
2.1	Chemikalien und Biomaterialien	18
2.2	Laborgeräte	20
2.3	Reporter Gene Assay	21
2.3.1	Plasmide	21
2.3.2	Plasmidherstellung	24
2.3.3	Transfektion	25
2.3.4	Inkubation	27
2.3.5	Fluoreszenzmessung	27
2.3.6	β-Galaktosidase-Assay	27
2.3.7	Bicinchoninsäureassay	28
2.4	Klonieren des MRE 2.1minus	28
2.5	Statistik und Datenverarbeitung	29

3.	**Ergebnisse**	31
3.1	Das MRE 1	31
3.2	Das MRE 2	36
3.3	Die Region 15 bp	40
3.4	Die Region MRE 2.1minus	41
3.5	Übersicht über den Proteingehalt der Promotorkonstrukte	45
3.6	Vergleich mit Dexamethason	47
3.7	MRE 1.3 Konzentrationsreihe	50
3.8	MRE 2.2minus Konzentrationsreihe	51
3.9	Übersicht MRE 1-MRE 1.3	52
3.10	Übersicht MRE 2-MRE 2.2minus	54
4.	**Diskussion**	57
4.1	MR-induzierte EGFR-Promotoraktivität	57
4.2	Untersuchung des MRE auf weitere Transkriptionsfaktorbindungsstellen mittels Transkriptionsfaktor-Bindungsanalyse	59
4.3	Ausblick	63
5.	**Zusammenfassung**	64
6.	**Literaturverzeichnis**	66
7.	**Thesen**	74

Abkürzungsverzeichnis

ACE	*Angiotensin-Converting-Enzyme*
AP-2	*Activator Protein 2*
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäureassay
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophsophat
CHIF	*Corticoid-Hormone Induced Factor*
DAG	Diazylglyzerin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED-1	Ectodysplasin-1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERB B1/2/3/4	v-*erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 1/2/3/4 (avian)*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
EGFP	*Enhanced Green Fluoreszent Protein*
EGFP-hMR	*Enhanced Green Fluoreszent Protein mit humanem Mineralokortikoidrezeptor*
ENaC	*Epithelial Na^+-Channel*
EMSA	*Electro Mobility Shift Assay*
ERDBP-1	*EGF Response DNA Binding Protein*
ETR	*EGFR Transcription Repressor*
ERK	*Extracellular-regulated Kinase*
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
FKS	fetales Kälberserum
GILZ	*Glucocorticoid-induced leucine zipper protein*
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	*Glucocorticoid Response Element*
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hAR	humaner Androgenrezeptor
HER 2/3/4	*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/3/4*
hGR	humaner Glukokortikoidrezeptor

hMR	humaner Mineralokortikoidrezeptor
hÖR	humaner Östrogenrezeptor
hPR	humaner Progesteronrezeptor
HRE	Hormon-Responsives Element
11βHSD	11β-Hydroxysteroiddehydrogenase
ICAM-1	*Intracellular Adhesion Molecule-1*
iNOS	*inducible NO Synthetase*
Kb	*Kilo base* (= 1000 Basenpaare)
Ki-Ras 2A	*Kirsten-Ras GTP-binding protein-2A*
LB-Agar	Luria-Bertani-Medium
MAPK	*Mitogen-activated Protein Kinase*
MCP-1	*Monocyte Chemoattractant Protein-1*
MEK	*Mitogen-activated Protein Kinase Extracellular-regulated Kinase Kinase*
MEM	*Minimum Essential Medium*
MOPS	(3-(N-Morpholin) propansulfonsäure
MRE	Mineralokortikoid Responsives Element
mRNS	messenger – Ribonukleinsäure
NDRG2	*N-Myc downstream regulated gene 2*
OK	*Opposum Kidney Cells,* Opossumnierenzellen
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SGK1	S*erum-Glucocorticoid-Regulated Kinase 1*
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SEM	*Standard Error of Mean,* Standardfehler
SOC	*Super-optimal-broth*-Bakteriennährmedium mit Glukose
SRC	*Steroid Receptor Coactivator*
STAT	*Signal-Transducer and Activator of Transcription*
TGF-α/ -β_1	*Transforming Growth Factor-α/ -β_1*
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	*Untranslated Region*
VDRE	Vitamin-D-Responsives-Element
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
Veh	Vehikellösung

1. Einleitung

1.1 Der Mineralokortikoidrezeptor

Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) NR3C2 ist ein Steroidrezeptor. Er gehört mit den anderen Steroidrezeptoren, nämlich dem Glukokortikoidrezeptor, dem Progesteronrezeptor, dem Östrogenrezeptor und dem Androgenrezeptor, zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren [1,2]. All diese Proteine sind Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren, d.h. nach der Ligandenbindung ändern sie ihre Konformation, dimerisieren, binden an spezifische Hormon-Responsive Elemente und bewirken so eine veränderte Expression ihrer Zielgene [3]. Homologien in den Genen und Proteinen dieser Rezeptoren lassen darauf schließen, dass diese sich im Laufe der Evolution aus einem Rezeptor entwickelt haben, wobei der Mineralokortikoidrezeptor die größte Ähnlichkeit zum GR (Glukokortikoidrezeptor) zeigt (Abb. 1) [4,5]. Er unterscheidet sich nur geringfügig von diesem. Dieser Unterschied bewirkt jedoch, dass Aldosteron den Glukokortikoidrezeptor in einem nanomolaren Konzentrationsbereich nicht mehr aktivieren kann [6]. Neuere Studienergebnisse stellen diese Ähnlichkeit in Frage und postulieren die größten Homologien zwischen dem Östrogen- und dem Mineralokortikoidrezeptor [7,8].

1.1.1 Gen

Das Gen des humanen Mineralokortikoidrezeptors befindet sich auf Chromosom 4 auf dem langen Arm, in der Region q31.1. Die Sequenz umfasst mehr als 450 kb, die mRNA 5915 bp. [9, 10] (vgl. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000901.4, 15.04.2012) Das Gen enthält 10 Exons. Die ersten beiden Exons namens 1α und 1β, werden nicht translatiert. Ihnen wird eine Steigerung der Stabilität des Transkriptes und die Effizienz der Translation zugeschrieben [11]. Diese zwei Exons werden in 5‘-Richtung von den beiden alternativen Promotoren P1 und P2 flankiert. Der Promotor P1 zeigt eine hohe Grundaktivität in Geweben wie Niere, Kolon, Uterus, Hoden, Schweißdrüsen und Leber. Die Aktivität des Promotors P2 ist ca. 10 Mal niedriger. Er scheint lediglich während der Fetalphase eine größere Rolle zu spielen. [12,13]. Da zwei Promotoren existieren, sind auch zwei mRNS vorhanden, die hMRα und hMRβ genannt werden. Sie werden in den Zielgeweben von Aldosteron koexprimiert [14]. Neben dem hMR, der alle 9 Exons translatiert enthält, existieren weitere Varianten des MRs, die durch alternatives *Splicen* entstehen. Die Bedeutung dieser MR-Varianten wird derzeit kontrovers diskutiert [15].

Einleitung

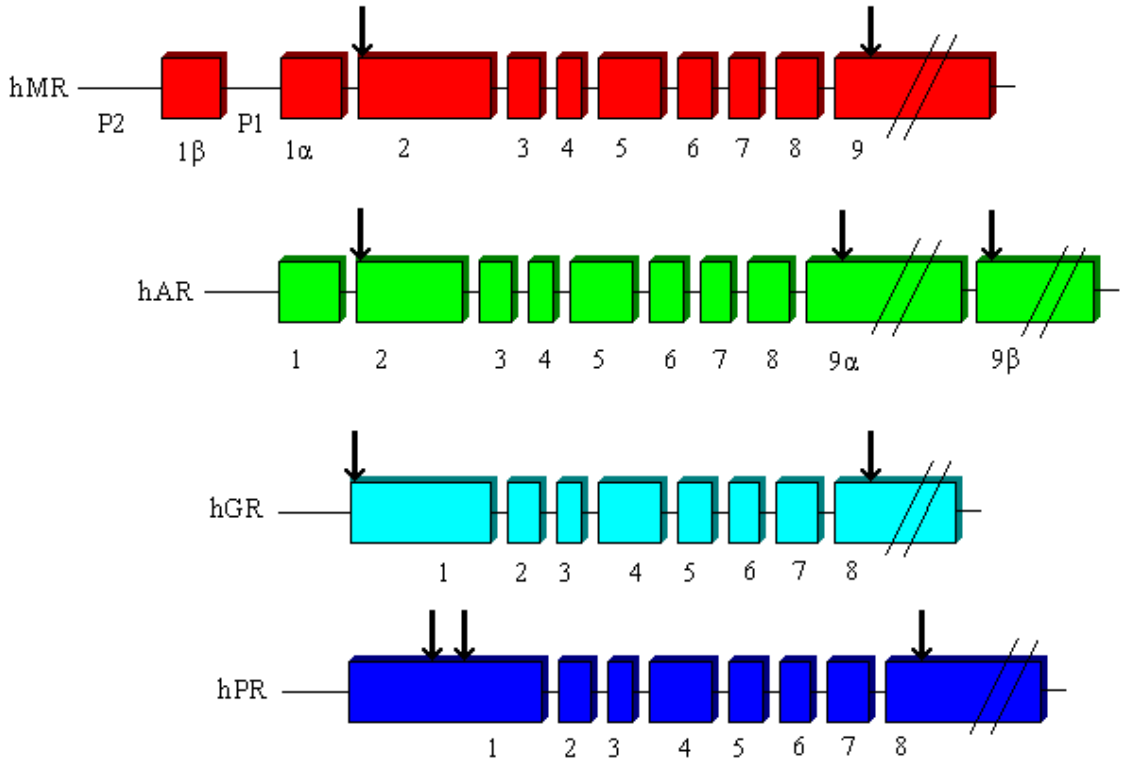

Abb. 1 Übersicht über die Gene der Steroidrezeptoren (nicht dargestellt, der hÖR), die Pfeile stellen die Start- und Stopcodons dar [11]

1.1.2 Protein

Das Protein des Mineralokortikoidrezeptors besteht aus vier funktionellen Domänen: Die N-terminale Domäne, die DNS-bindende Domäne, die Scharnierdomäne und die Liganden-bindende Domäne (Abb. 2). Diese 4 Domänen sind auch bei den anderen 49 Rezeptoren der Superfamilie der nukleären Rezeptoren des Menschen vorhanden [2,16,8]. Das Protein des MR umfasst dabei insgesamt 984 Aminosäuren [10].

Mit genau 602 Aminosäuren repräsentiert die N-terminale Domäne oder A/B-Region des MR die größte unter allen Steroidrezeptoren [9]. Da sie nur zu ca. 15 % Homologien zu den N-terminalen Domänen der anderen Steroidrezeptoren aufweist, scheint ihr eine Schlüsselrolle in der MR-Spezifität zuzukommen. In dieser Domäne befinden sich zwei Liganden-unabhängige Transaktivierungsdomänen (*Activation-Function* 1 a und -1 b) (AF-1a und -1b), siehe Abbildung 2. Zwischen AF-1a und-1b liegt zudem eine inhibitorische Region, welche Korepressoren rekrutieren kann [17,18]. Die Transaktivierungsdomänen werden mit Promotor- und/- oder Zellselektivität in der Transaktivierungsfunktion in Zusammenhang gebracht. Außerdem wurde ein Synergismus zwischen AF-1a und 1b demonstriert [19]. Der AF-1a kommt eine entscheidende Rolle in der Liganden-induzierten Transaktivierungsaktivität zu [19]. Neben der Transaktivierungsfunktion interagiert die N-terminale Domäne mit der Liganden-

Einleitung

bindenden Domäne. So wird die Rezeptorkonformation stabilisiert. Dies geschieht unabhängig von Kofaktoren [16,18].

Die DNS-bindende Domäne oder C-Region umfasst 66 Aminosäuren und enthält zwei Zinkfingerstrukturen, die an die DNS der Zielgene binden, die sogenannten Hormon-Responsiven Elemente (HRE). Darüber hinaus ist die Region an der Rezeptor Homo- und Heterodimerisierung beteiligt. Die C-Region ist ferner die am höchsten konservierte Region unter allen Steroidrezeptoren [18,20].

Die Scharnier- oder D-Region besteht aus 61 Aminosäuren. Sie enthält eine Prolin-reiche Struktur, welche eine Drehung zwischen Liganden-und DNS-bindender Domäne erlaubt. Außerdem vermutet man hier eine Struktur, die für Homodimerisierung verantwortlich sein könnte [17].

Die Liganden-bindende Domäne oder E-Region besteht aus 251 Aminosäuren, die aus zwölf α-Helices und einem β-Faltblatt aufgebaut ist. Sie ist in drei antiparallelen Schichten strukturiert. Den Helices drei und fünf liegt die Liganden-Spezifität und -Sensitivität des MR zugrunde. Die Helices drei, vier, fünf und zwölf bilden die Transaktivierungsdomäne AF-2. Bei Abwesenheit der Liganden führen Konformationsänderungen innerhalb des MR zur Ausbildung von Kontaktstellen, welche Interaktionen mit Chaperonen wie Immunophilinen, Hitzeschockprotein 70 und 90, p23, Serin/Threonin Phosphatase 5 (PP5) sowie Cyclophilinen wie *FK506-binding protein 51* und - *52* (FKBP), ermöglichen [18,21]. Dabei ist ein Komplex aus HSP90 und FKBP51 zusammen mit dem Motorprotein Dynein an der Translokation des MR in den Zellkern beteiligt [18].

Kommt es zum Kontakt mit einem Liganden, induziert dieser eine kompaktere Struktur des MR, wobei die an der Bildung der AF-2 beteiligten Helices eine hydrophobe Tasche bilden, an die der Ligand binden kann. Die Liganden-bindende Domäne enthält außerdem Kontaktstellen für eine Heterodimerisierung mit dem GR [17,19].

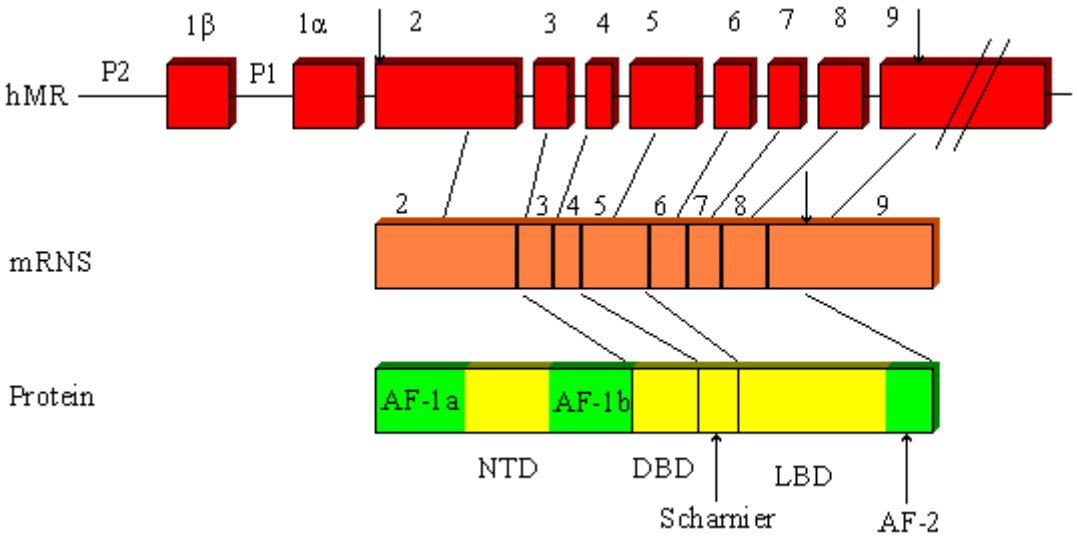

Abb. 2 Übersicht über Gen, mRNS und Protein des hMR, die unbeschrifteten Pfeile stellen Start- bzw. Stopcodons dar [9,11]

1.1.3 Koaktivatoren und –repressoren

An den Mineralokortikoidrezeptor binden eine Vielzahl von Koaktivatoren. Allerdings sind nur wenige davon für den MR spezifisch. Die einzelnen Steroid-Rezeptor-Koaktivatoren (*Steroid Receptor Coactivator*, SRC) der SRC-1- und -2-Gruppe binden mit hoher Affinität, wie auch bei den anderen Steroidrezeptoren beschrieben, an den MR [21]. Dabei binden sie an LXXLL-Motive (L = Leucin, X = beliebige Aminosäure) der Transaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2. Die Bindung bewirkt eine schwache Aktivierung des Enzyms Histonacetyltransferase über die Interaktion mit den Koaktivatoren CBP (*CREB Binding Protein*) und p300 [22]. Diese aktivieren stark die Histonacetyltransferase sowie die RNS Polymerase II. Diese Aktivierung wurde bei keinem anderen Steroidrezeptor beobachtet [15,21]. Der Koaktivator PGC-1α (*PPAR-γ Coactivator 1*) aktiviert ebenfalls den MR über Bindung an die AF-2. Dadurch wird nicht nur die Histonacetyltransferase, sondern auch die Bindung anderer nukleärer Faktoren zum Transkriptionsinitiationskomplex erleichtert. Die physiologische Wirkung dieses Faktors ist allerdings unklar, da er z. B. in der Niere nur im proximalen Tubulus exprimiert wird, der MR dagegen im distalen Tubulus und den Sammelrohren [21].

Der Faktor ELL (*11-19 Lysine-rich Leukaemia*), benannt nach seiner Rolle in der Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie, aktiviert spezifisch den MR über die AF-1. Dadurch wird die RNS Polymerase II aktiviert. Im Gegensatz dazu senkt er die Transaktivierung des GR. Ein Einfluss auf die anderen Steroidrezeptoren ist nicht vorhanden. In Anwesenheit von Aldosteron wird er hochreguliert, d.h. die Expression dieses Faktors steigt schnell an [23].

Die Faktoren FAF-1 (*Fas-Associated Factor-1*) und FLASH (*FLICE-Associated huge protein*) interagieren mit dem MR und dem GR über die AF-1 [24].

Einleitung

TIF-1α und RIP140 binden an die A/B-Region des MR an und scheinen nur allgemein aktivierende Funktion zu haben [15].

Es sind nur wenige Korepressoren des MR bekannt. Der NCoR (*Nuclear receptor Corepressor*) und SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor*) binden an die Liganden-bindende Domäne und aktiveren die Histondeacetylase. DAXX (*Death domain-associated protein*) bindet wie FAF-1 und FLASH an die AF-1 und reguliert Apoptoseprozesse. Weiterhin unterdrückt es die MR-Transaktivierung in manchen Zelllinien [21].

PIAS1 (*Protein Inhibitor of Activated STAT1*) schließlich hemmt die Aldosteron-aktivierte Transaktivierung des MR über Interaktion mit der Liganden-bindenden Domäne. Auf die Basalaktivität des MR und GR hat PIAS1 keinen Einfluss [21,24].

Der Faktor NF-YC *(Nuclear Transcription Factor Y, gamma)* fungiert als Korepressor des MR über die AF-1. Er liegt als heterotrimerer Faktor ubiquitär vor. Dieser Faktor erkennt CCAAT-Motive in den Promotoren und *Enhancer*-Strukturen der von ihm regulierten Gene [21].

1.1.4 Liganden am Mineralokortikoidrezeptor und Mineralokortikoidrezeptor -Spezifität

An den Mineralokortikoidrezeptor können sowohl die Mineralokortikoide 11-Desoxycorticosteron und Aldosteron als auch die Glukokortikoide Cortisol und Corticosteron sowie auch Progesteron binden. In vitro weisen sie dabei eine gleich hohe Affinität auf [25,26]. Im Gegensatz dazu bindet Aldosteron spezifisch nur an den MR. Da Cortisol in 100- bis 1000-fach höherer Konzentration im Plasma vorliegt, müssten alle Mineralokortikoidrezeptoren mit Cortisol besetzt sein, selbst wenn man das Cortisol, welches im Plasma an das *Cortisol Binding Protein* gebunden ist, subtrahiert.

Das Enzym 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (11β-HSD2) wandelt die Glukokortikoide in ihre 11-Ketoanaloga um, die nicht an den MR binden können. Die 11β-HSD2 ist in den Nieren, Dickdarm, Gefäßendothel, Salz- und Schweißdrüsen lokalisiert, sodass diese als klassische Zielgewebe von Aldosteron gelten. In Geweben wie Herz, Hippocampus oder Makrophagen wird dieses Enzym dagegen nur sehr wenig exprimiert [25,27,28].

Durch diesen Mechanismus wird am MR auf Prärezeptorebene eine gewisse Spezifität erzielt.

Der Nachweis der Koexpression von MR und 11β-HSD2 in zahlreichen Geweben und Zelltypen wie Adipozyten, Osteoblasten/-klasten und Mikroglia, Herz und Gehirn stellt diese Unterteilung in klassische und nicht-klassische Zielgewebe von Aldosteron allerdings zunehmend in Frage [26].

Bei Ausfall der 11β-HSD2 kommt es durch die Daueraktivierung des MRs durch Cortisol zu exzessiver Hypertonie [27]. Beobachtungen in Tierversuchen geben Hinweise darauf, dass Cortisol in Abhängigkeit vom Redoxstatus der Zelle auch als Antagonist am MR wirken kann [29].

Einleitung

Weitere Mechanismen, über die MR-Spezifität vermittelt wird, sind auf Rezeptorebene Liganden-abhängige Konformationsänderungen. So ist die Interaktion zwischen der N-terminalen Domäne und der Scharnierregion bzw. Liganden-bindende Domäne in Anwesenheit von Aldosteron stärker ausgeprägt als bei der von Cortisol, sodass diese die Bindung von Aldosteron stabilisiert. Darüber hinaus dissoziiert Aldosteron langsamer vom MR als Cortisol und bewirkt eine stärkere Transaktivierung als Glukokortikoide [21,23]. Auf Postrezeptorebene bewirken die in Kapitel 1.1.3 dargestellten Koaktivatoren- und Repressoren am MR für Aldosteron spezifische Effekte.

Im Gegensatz dazu verdient Aldosteron als Hauptligand am MR eine genauere Betrachtung. Es wird in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde aus Cholesterin von den Enzymen der P450-Familie gebildet. Die Regulation erfolgt über verschiedene Systeme. Entscheidend für die Synthese und Sekretion dieses Hormons ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Bei Blutdruckabfall oder Na^+-Mangel an der *Macula densa* sowie Aktivierung von Barorezeptoren über renale β1-adrenergen Rezeptoren kommt es zur Ausschüttung der Protease Renin aus dem juxtaglomerulärem Apparat. Dieses Enzym spaltet von dem in der Leber gebildetem Angiotensinogen eine spezifische Aminosäuresequenz ab und aktiviert es so zu Angiotensin I. Dieses Protein wird von einem weiteren Enzym, dem im Endothel vorkommendem *Angiotensin-Converting-Enzyme* (ACE), in das aktive Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II bewirkt neben einer Vasokonstriktion und der Ausschüttung von Vasopressin aus der Neurohypophyse vor allem die Bildung und Freisetzung von Aldosteron. Weitere Auslöser der Aldosteronproduktion sind die Ausschüttung von ACTH (adrenocorticotropem Hormon) und ein hoher extrazellulärer K^+-Spiegel. Auch die hemmende oder stimulierende Wirkung von anderen Botenstoffen wie Adrenalin, Serotonin, Atrialer Natriuretischer Faktor u.a. wurde auf die Aldosteronbiosynthese berichtet. Allerdings scheint deren Bedeutung eher geringfügig zu sein [31,32].

Die lokale Bildung von Aldosteron in anderen Geweben wie Endothel und glatter Muskulatur des Blutgefäßsystems wurde indirekt über die an der Bildung von Aldosteron beteiligten Enzyme oder über Kofaktoren wie Adrenodoxin und StAR nachgewiesen [31]. Dies gilt ebenso für den MR, der aber häufig nur auf mRNS-Ebene nachgewiesen werde konnte [13]. Die Angaben zur Bildung von lokalem Aldosteron sind widersprüchlich. Offenbar wird Aldosteron nur im fetalen Herzen und bei Herzversagen produziert. Im Kardiomyozyten von gesunden Erwachsenen sind dagegen nur mRNS von einigen bei der Aldosteronsynthese beteiligten Enzymen nachgewiesen worden [33]. Eine auto- und parakrine Wirkung von Aldosteron sowie von 11-Desoxycorticosteron im gesunden Herzen von Erwachsenen, wird postuliert [33].

Auch im Gehirn wurde die Bildung von lokalen Mineralokortikoiden nachgewiesen. Dies war im Hippocampus, *Gyrus dentatus* und in den Körner- und Purkinjezellen des Kleinhirns der Fall

[34,31]. Der MR wurde ebenfalls im Hippocampus und in den Körnerzellen, des Weiteren auch im Septum gefunden. Offenbar ist diese lokale Produktion von Mineralokortikoiden und deren Rezeptoren an der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse beteiligt.
Dies wird aber kontrovers diskutiert, da die bisherigen Ergebnisse überwiegend aus Tierexperimenten stammen [31]. Gegen die These der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse spricht außerdem, dass das *Multidrug-P-Resistance Protein* Steroidhormone über die Blut-Hirn-Schranke nach peripher transportiert. Weiterhin konnte die Verabreichung von Aldosteronantagonist RU 28318 intracerebroventrikulär nicht die systemischen Wirkungen von Mineralokortikoiden verhindern [35].

1.1.5 Signaltransduktion und allgemeine Wirkung

Nach der Bindung von Aldosteron an den MR führt dies zur Dissoziation von seinem Chaperone-Komplex und zur Homodimerisierung des Rezeptors. Eine Heterodimeriserung mit dem GR an Stelle der Homodimerisierung ist ebenfalls möglich [34].
Der dimerisierte Rezeptor bindet anschließend an die Hormon-Responsiven-Elementen seiner Zielgene und leitet so über die Stimulation derer Promotoren die Transkription und Translation derselben ein. Bisher sind nur *Glucocorticoid Response Elements*, aber keine spezifischen *Mineralocorticoid Response Elements* bekannt [1,36].
Die Struktur der klassischen *Hormone Response Elements* umfasst 15 Basenpaare. Sie besteht aus einem beliebigen Trinukleotid, flankiert von zwei Hexamer-Halbpalindromen. GR und MR können am GRE binden. Die HREs der anderen Steroidhormone sind dem GRE sehr ähnlich [1]. An jedes dieser Halbpalindrome kann je ein Rezeptorprotein des dimerisierten Rezeptors binden [36].

1.1.6 Epitheliale genomische Wirkung

Aldosteron wirkt auf die Epithelien von Niere (distales Nephron und Sammelrohr), Kolon, Pankreas, Speichel- und Schweißdrüsen. Auch die Ausbildung von Mineralokortikoidrezeptoren in Mamma, Lunge und Dünndarmepithelien ist bekannt, allerdings in reduzierter Anzahl [31,36,37]. Der MR konnte auch in einer Vielzahl weiterer Epithelien nachgewiesen werden, z.B. im Ösophagus und Magen sowie weiteren Lokalisationen der Niere [26]. Der mit Aldosteron aktivierte MR führt in den Zielzellen zur Bildung von Ionenkanälen bzw. –pumpen oder zur Synthese von Signalproteinen (siehe Abb. 3).
Aldosteron bewirkt über die vermehrte Expression bzw. den verringerten Abbau des Amilorid-sensitiven Epithelialen Natrium Kanals, (*Epithelial Na^+-Channel*, Abk. ENaC) oder über eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit, eine Natriumabsorption aus dem Lumen des jeweiligen Organs. Dies wird über das Nedd4-Protein (*neural precursor cell-expressed developmentally*

downregulated (gene 4) protein) gesteuert [38]. An der basalen Membran der Zellen werden die Natrium-Ionen durch die Oubain-sensitive Na^+/ K^+-ATPase in das Blut transportiert. Der aktivierte MR induziert dabei nicht nur eine gesteigerte Expression der Na^+/ K^+-ATPase, sondern auch eine vermehrte Rekrutierung bereits gebildeter Pumpen und eine gesteigerte Affinität dieser zu Na^+. Dabei ist die Natriumabsorption durch die ENaC der geschwindigkeitslimitierende Schritt. Die vermehrte Bildung von luminalen Thiazid-sensitiven Na^+/Cl^-Kotransportern im distalen Nephron und den Na^+/H^+-Austauschern im Kolon durch Aldosteron wurde ebenfalls beschrieben [31,39].

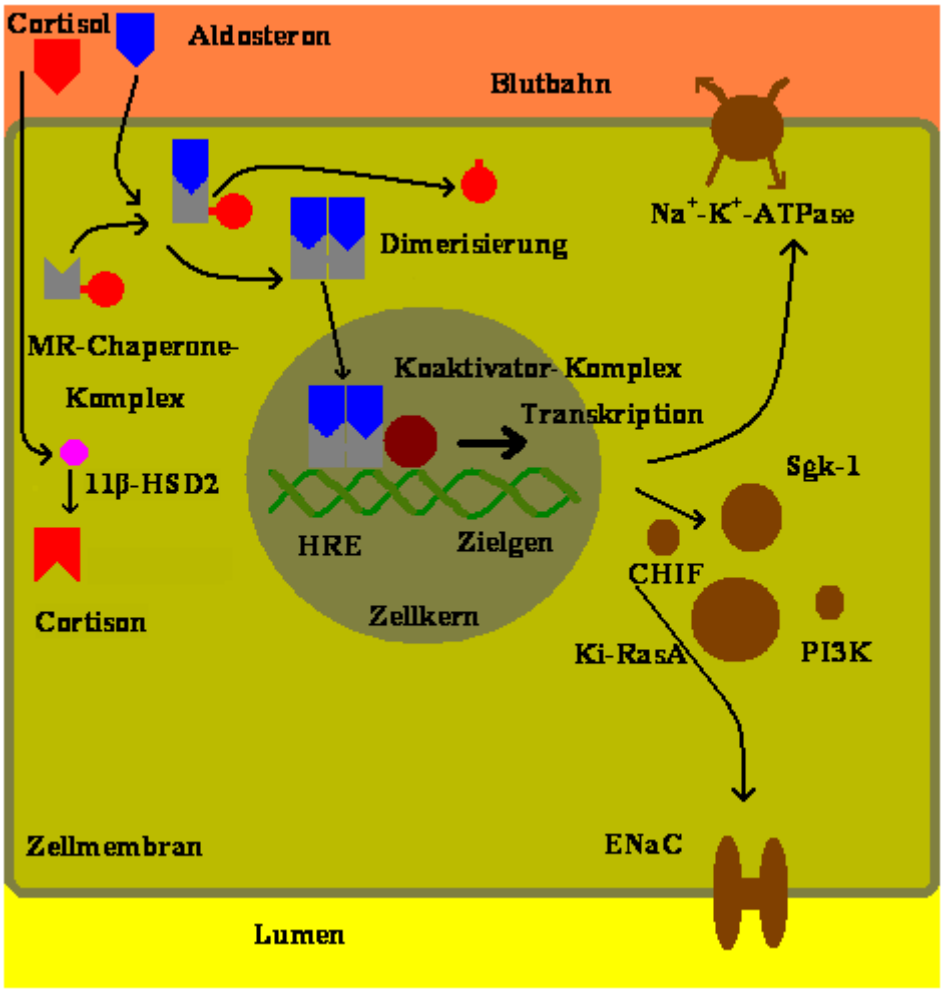

Abb. 3 Übersicht über die epitheliale Wirkung von Aldosteron, hier am Beispiel einer Hauptzelle im distalen Sammelrohr der Niere [21,31]

Die im folgenden genannten, von Aldosteron induzierten Signalproteine regulieren partiell die Aktivität der genannten Ionentransporter. So reguliert die Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase 1 (*Serum-Glucocorticoid-Regulated Kinase 1* Abk. SGK1) über die Phosphorylierung des Enzyms Nedd 4-2 den ENaC. Sie steuert aber außerdem auch andere Ionen transportierende Proteine wie die Na^+/ K^+-ATPase und den $Na^+/Cl^-/K^+$-Symporter. Sie gehört zur Klasse der

Einleitung

Serin-Threonin-Kinasen. Knock-out-Mäuse, denen die SGK1 fehlt, entwickeln einen Pseudohypoaldosteronismus mit Hyperkaliämie und renalen Na^+-Verlusten [31,39]. Die Phosphorylierung der SGK1 hemmt außerdem einen Repressorkomplex, bestehend aus der Histon H3 Lys-79 Methyltransferase Dot 1a und Af9, einem DNS-Sequenz spezifisch bindenden Protein. Af9 bindet an den Promotor des ENaC und unterdrückt die Transkription dieses Kanals zusammen mit Dot 1a. Die Aldosteron-induzierte SGK1 blockiert nicht nur diesen Repressorkomplex, sondern bewirkt auch eine verminderte Transkription von Dot 1a und Af9 über epigenetische Mechanismen [40].

Aldosteron bewirkt weiterhin über das *Kirsten-Ras GTP-binding protein-2A* (Abk. Ki-Ras 2A) eine Aktivierung des ENaC. Diese Wirkung tritt innerhalb von Minuten ein. Bei Überexpression dieses Proteins in Tierversuchen kam es langfristig zu einem Abbau des ENaC [31]. Gleichzeitig senkt dieses G-Protein über den Raf-MEK-ERK-Signalweg die ENaC-Aktivität [38].

Auch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) wird über Aldosteron und die SGK1 aktiviert, aber nicht verstärkt exprimiert. Sie bewirkt eine gesteigerte Bildung sowie eine forcierte Aktivität von ENaC und der Na^+/ K^+-ATPase. Auch im Second-Messenger-Mechanismus von Insulin und Vasopressin spielt sie eine Rolle [41].

Des Weiteren wird von Aldosteron der Kortikoid-Hormon-induzierte Faktor (*Corticoid-Hormone Induced Faktor*, Abk. CHIF) induziert. Er ist basolateral in Epithelien von Kolon und distalem Nephron nachweisbar und gehört zur Gruppe der FXYD transmembranen Proteinen. Vermutlich steigert er die Bildung der Na^+/ K^+-ATPase [31].

Schließlich steigert das Glukokortikoid-induzierte Leucin Zipper Protein (*Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper protein* Abk. GILZ) die Expression der ENaC.

1.1.7 Nicht-epitheliale Wirkung

Die epithelialen Wirkungen von Aldosteron sind länger bekannt. Die Wirkung von Aldosteron lässt sich durch die kompetetiven Antagonisten Spironolacton und Eplerenon aufheben. Diese Pharmaka wurden zunächst als Diuretika und bei Hyperaldosteronismus (M. Conn) eingesetzt [42]. Im Jahr 1999 wurde die Wirkung von Spironolacton bei Patienten mit Linksherzinsuffizienz in einer großen Studie getestet (RALES) [43]. Im Jahr 2003 erfolgte die Erprobung von Eplerenon in einem ähnlichem Kontext (EPHESUS) [44]. Beiden Studien gemein war eine dramatische Senkung von Morbidität und Mortalität der Patienten mit Herzversagen. Später wurde sogar postuliert, dass Eplerenon teilweise die Wirkungen von Aldosteron auf das Herz-Kreislaufsystem wieder rückgängig machen kann [45]. Ebenso wurde eine Reduktion von Proteinurie im Sinne einer Nephroprotektion beobachtet [29]. Eine Blutdrucksenkung durch die antidiuretische Wirkung dieser Medikamente schied als Ursache

aus, da in beiden Studien die Gabe der beiden Stoffe unterhalb der blutdrucksenkenden Konzentration erfolgte. Dies deutet darauf hin, dass Aldosteron/ der MR hier ihre Wirkung an nicht klassischen epithelialen Geweben entfalten, z. B an vaskulären Zellen. Dies wird gestützt durch die Beobachtung, dass bei Patienten mit M. Conn unabhängig vom Blutdruck, eine erhöhte Anzahl von kardiovaskulären Ereignissen nachweisbar ist, im Vergleich zu Patienten mit anderen Formen der Hypertonie [46]. In der Folgezeit wurde der Mineralokortikoidrezeptor in Endothel, glatten Gefäßmuskelzellen, im Herz und im Zentralnervensystem nachgewiesen (siehe 1.1.4). Eine Expression des MR ist auch in einer Reihe anderer Gewebe belegt, so z.B. in Knochen, Skelettmuskulatur, Fettgewebe und im Immunsystem [26].

Die Wirkung von Aldosteron auf das Herz-Kreislaufsystem kann mit epithelialer Dysfunktion, Inflammation, oxidativem Stress und Fibrose zusammengefasst werden [38] (siehe Abb. 4). Dabei spielen vielfältige Mechanismen eine Rolle, deren Zusammenspiel bis jetzt noch unvollständig verstanden ist. So wurde die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Induktion von Untereinheiten der NADPH-Oxidase und eine verminderte Expression der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Endothel nachgewiesen. Diese reaktiven Sauerstoffspezies inaktivieren einen Kofaktor der NO-Synthetase, Tetrahydrobiopterin und NO selbst. Zudem inaktiviert Aldosteron indirekt die NO-Synthetase durch Dephosphorylierung. Die verminderte NO-Produktion führt damit indirekt zu Vasokonstriktion, Inflammation und damit letztlich zu Hypertonus. Dabei interagiert Aldosteron teilweise mit den Signalwegen von Angiotensin II (siehe 1.1.4) [42]. Weiterhin wurde in Tiermodellen die vasodilatorische Wirkung von Acetylcholin durch Aldosteron aufgehoben [47].

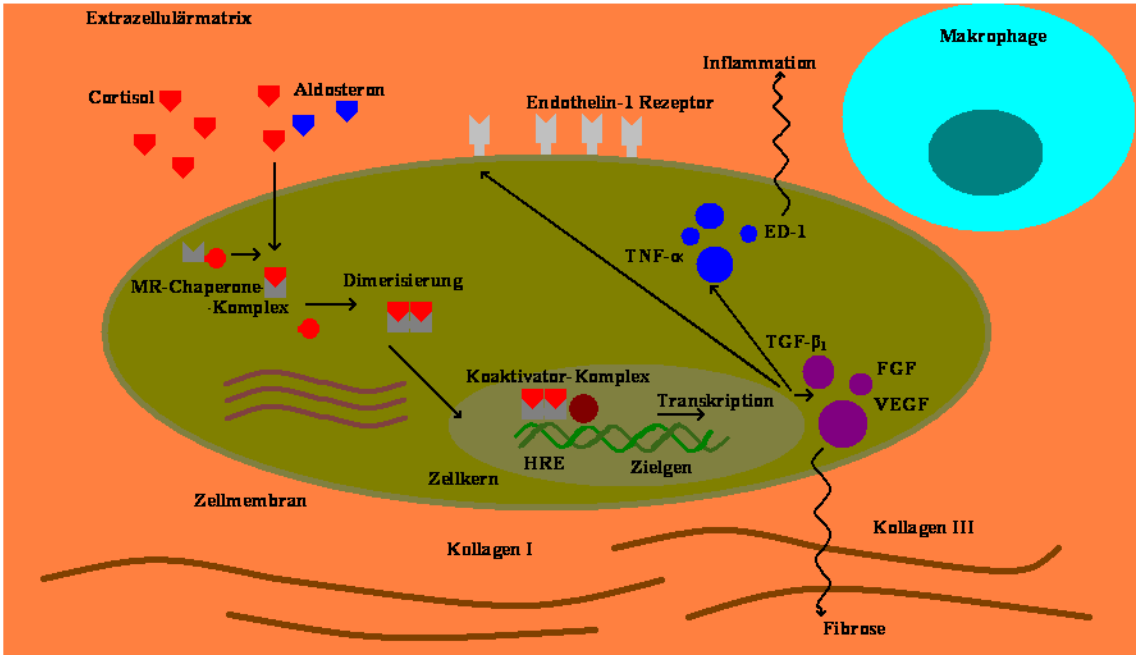

Abb. 4 Übersicht über die nicht-epithelialen Wirkungen des MR, am Beispiel einer glatten Gefäßmuskelzelle [30]

Einleitung

Im Gefäßmuskel führt Aldosteron über die Infiltration von Monozyten und Makrophagen sowie über die Bildung der Cyclooxogenase II, Osteopontin, MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) und ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule-1*) zu entzündlichen Veränderungen des Gewebes. Für Kardiomyozyten und Nierengewebe sind ähnliche Mechanismen nachgewiesen worden [42]. Weiterhin induziert Aldosteron eine Fibrose des Gewebes. Dies beruht auf einer gesteigerten Anzahl von Endothelin-1 Rezeptoren und der vermehrten Synthese von Kollagen I und III [29]. Diese Wirkung von Aldosteron basiert auf der Produktion von Entzündungsmediatoren wie TNF-α (Tumor Nekrose Faktor-α) und ED-1 (*Ectodysplasin-1*), Wachstumsfaktoren wie TGF-β_1 (Transforming Growth Factor-β_1), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) und VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), Matrix-Metalloproteasen und von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) [42].

1.1.8 Nicht-genotrope Wirkung

Nach einer Studie von Manolagas zur schnellen Wirkung von Sexualhormonen sind nicht-genotrope Wirkungen von Aldosteron solche, die sich weder durch Transkriptionshemmer wie Actinomycin, noch durch Translationshemmer wie Cycloheximid inhibieren lassen [48]. Sie treten innerhalb kurzer Zeit auf, können jedoch auch mehrere Tage anhalten. Es bestehen deutliche Hinweise, dass die nicht-genotrope Wirkung von Aldosteron über Second-Messenger genomische Wirkungen des MR nach sich ziehen kann [49]. Nicht-genotrope Wirkungen wurden sowohl für epitheliale als auch nicht-epitheliale Zielgewebe beschrieben. Dabei sind eine Vielzahl von Second-Messenger-Systemen involviert sowie Koaktivatoren und der MR selbst . So sind u.a. Ca^{2+}, die Proteinkinasen A, -B, -C, -D, Inositol-3-phosphat, cAMP und Diazylglyzerin (DAG), ebenso wie MAP-Kinasen, die ERK-1/2 und der EGFR in diese Second-Messenger-Wege integriert [49,50]. Einige Studien scheinen zu belegen, dass der MR an diesen schnellen Wirkungen über die genannten Second-Messenger nicht beteiligt ist. So konnte ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Aldosteron auch in Abwesenheit des MR beobachtet werden [51]. Andere dagegen berichten von der Inhibition dieser Wirkungen durch RU 28318 Aldosteronantagonisten. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Inhibition der 11βHSD zu schnellen genomischen Effekten durch Cortisol führt. Schließlich zeigten erst Zellen ohne natürlichen MR, die mit dem MR transfiziert wurden, diese schnellen Wirkungen [51]. Die Existenz eines membranständigen Aldosteronrezeptors wurde postuliert, da nicht-genotrope Wirkungen selbst in Geweben ohne MR wie z.B. MR-Knockout-Mäusen nachgewiesen wurden [52].

Ein weiterer Mechanismus der nicht-genotropen Wirkung von Aldosteron beruht auf der post-transkriptionalen Regulation MR-abhängiger Gen-Expression [49,53].

Einleitung

1.2 Der Epidermal Growth Factor Receptor

Der EGFR (auch ERB B1) gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen. Mit dem HER2/ ERB B2, HER3/ ERB B3 und HER4/ ERB B4 bildet er eine Subfamilie. Nach der Bindung eines Liganden bilden die Rezeptoren Homo- oder Heterodimere und die Kinaseaktivität initiiert in der Zelle über verschiedene Signalwege Schlüsselprozesse wie Zelldifferenzierung, Proliferation und Gewebshomöostase [54].

1.2.1 Gen

Das Gen des EGFR befindet sich auf Chromosom 7 in Region p12.1 bis 3. Es umfasst ca. 200 kb und 28 Exons. Exon 1 kodiert die DNS für die 5‘-UTR (*Untranslated Region*) und ein Signalpeptid, die extrazelluläre Domäne ist durch Exons 2-16 kodiert. Zwei Cystein-reiche Regionen werden durch die Exons fünf bis sieben und 13 bis 16 kodiert. Die DNS für die Transmembrane Domäne enthält Exon 17, die für die Tyrosinkinase-Domäne Exons 18-24 und die C-terminale Domäne Exons 25-28. Es existierten eine Vielzahl von mRNS des EGFR durch alternatives *Splicen*. Da diesen Rezeptoren wichtige Domänen fehlen (z. B. die transmembranäre Domäne, Tyrosinkinase-Domäne und C-terminale Domäne bei der humanen Krebszelllinie A 431), wird ihre Rolle weiterhin kontrovers diskutiert, ebenso wie die Funktion des extrem langen, 123 kb umfassenden Introns 1 [55,56]. Da das Gen ein Protoonkogen darstellt, führen Mutationen zur Kanzerogenese [57]. Die Analyse von diesen Mutationen liegt im Fokus höchster wissenschaftlicher Anstrengungen.

1.2.2 Protein

Wie alle Rezeptortyrosinkinasen besteht der EGFR aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranären Domäne, einer Tyrosinkinasedomäne und der C-terminalen Domäne.
Die extrazelluläre Domäne wird in vier Subdomänen unterteilt, wobei Domäne I und III die Liganden binden. Domäne II und IV sind Cystein-reiche Regionen. Die C-terminale Domäne enthält mehrere Autophosphorylierungsstellen [55].

1.2.3 Liganden am Epidermal Growth Factor Receptor

Es sind sieben Liganden nachgewiesen worden, die an den EGFR binden können: EGF, TGF-α, *heparin-binding EGF-like Growth Factor*, Amphiregulin, Betacellulin, Epiregulin und Epigen. Den Liganden gemein ist das EGF-Modul, eine 40 Aminosäuren lange Sequenz, die drei Disulfidbrücken ausbildet. Daneben bestehen sie aus einer N-terminalen Domäne, einer transmembranären Domäne und einer C-terminalen Domäne. Die Liganden werden als

transmembränere Moleküle ausgebildet und dann durch proteolytische Spaltung freigesetzt. Dabei kommen der C-terminalen Domäne verschiedene Funktionen in der Proteininteraktion zu [58]. Der Rezeptor bildet nach Bindung von EGF oder TGF-α Homodimere aus. Dabei sind die Domänen II und IV der extrazellulären Domäne für die Dimerisierung verantwortlich.

Der EGFR kann auch mit dem HER/ ERB B2 Heterodimere bilden. HER2 ist ein sogenannter *Orphan Receptor*, d.h. es sind keine Liganden für den HER2 bekannt. Dieser Rezeptor kann jedoch mit dem EGFR heterodimerisieren. Er steigert so die Ligandenaffinität und erzeugt ein stärkeres Signal [59,60]. Es sind auch Heterodimere des EGFR mit HER3 und HER4 möglich [61]. Insgesamt sind 4 Homo- und 6 Heterodimere der ERB-Familie bekannt [59].

1.2.4 Aktivierung, Signaltransduktion und Transaktivierung

Zur Aktivierung des EGFR sind jeweils zwei Ligandenmoleküle notwendig. Dabei bindet jeweils ein Ligand an einen Rezeptor, der dann dimerisiert. In dem inaktiven EGFR ist die hydrophobe Tasche der Domäne III verdeckt, was die Autoinhibition des Rezeptors zur Folge hat. Durch Liganden kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptorproteins um 130°, der Freilegung der Ligandenbindungsstellen sowie der Bindung der Liganden an die Domänen I und III (wie oben beschrieben). Daraufhin erfolgt eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten, an die verschiedene Enzyme oder Adapterproteinen mit SH2- oder PTB Domäne binden können [60,62]. Welches dieser Enzyme und Adapterproteine bindet, hängt von der Zusammensetzung des Rezeptorhomo- bzw. heterodimer ab. Das jeweilige Protein aktiviert daraufhin spezifische Signalwege der Zelle.

Einleitung

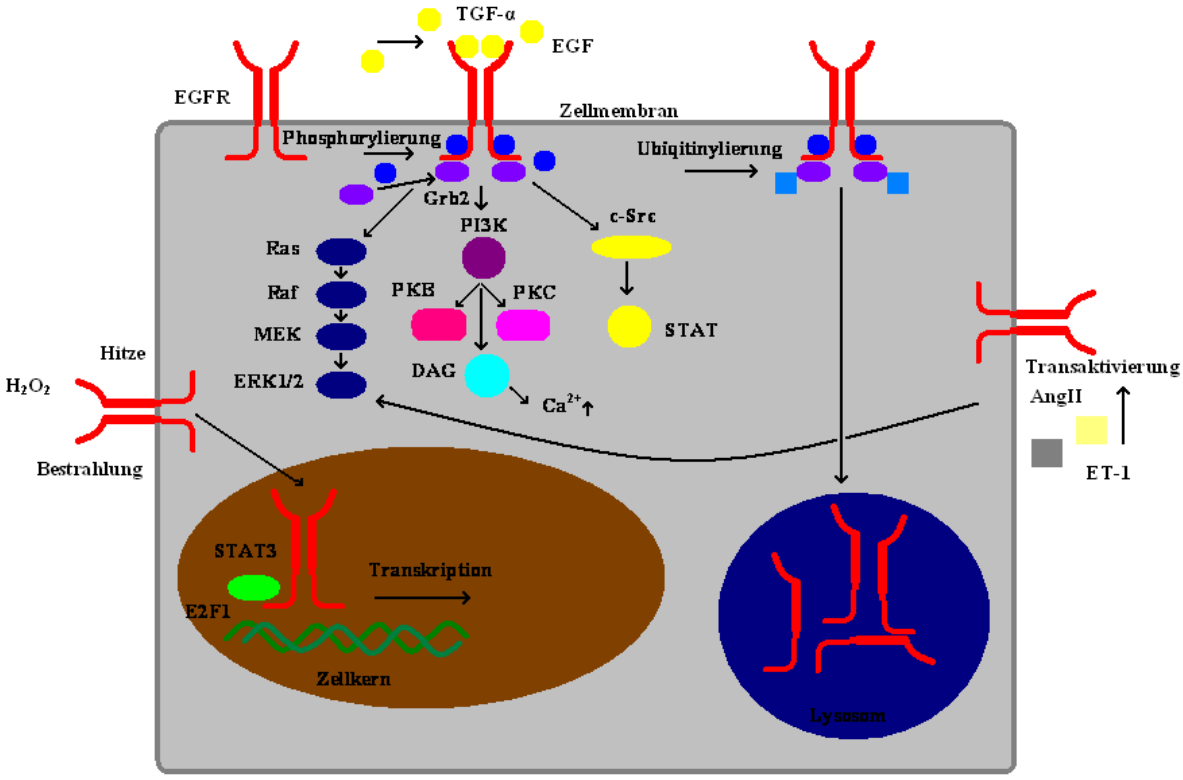

Abb. 5 Übersicht über die Wirkungen des EGFR, es ist nur eine Auswahl dieser Wirkungen abgebildet, [60,63]

Der EGFR ist in die Signaltransduktion von zahlreichen Second-Messenger-Wegen involviert (siehe Abb. 5). So aktiviert das Adapterprotein Gab1 schwach über Grb2 die PI3K und initiiert so die Signalkaskade der Proteinkinasen B und –C (PKB und PKC, siehe Abb. 5). Die Phospholipase Cγ führt über die Mobilisierung von Inositoltriphosphat zur intrazellulären Erhöhung des Ca^{2+} Spiegels. Die zytoplasmatische Tyrosinkinase c-Src stimuliert u. a. STAT-Proteine (*Signal-Transducer and Activator of Transcription*). Diese fördern die Transkription von Zytoskelettproteinen wie Dynamin und Clathrin. Die c-Src bewirkt synergistisch mit dem EGFR zusammen außerdem Tumorinvasivität, Zellproliferation und Kancerogenese. Der EGFR aktiviert über Shc und Grb2 das kleine G-Protein Ras. Dies zieht eine Stimulation von Raf und der MEK (ERK-MAPK-Kinase) nach sich. Die aktivierte ERK -1/2 phosphoryliert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Fos oder Elk-1. Es sind noch zahlreiche weitere Adapterproteine und Second-Messenger-Wege bekannt [61].

Protein-Tyrosin-Phosphatasen und Endozytose des aktivierten EGFR sind Mechanismen, über die der Rezeptor gehemmt werden kann. Ein weiterer inhibitorischer Mechanismus beruht auf der Expression von Genen, die über EGFR-Signalwege aktiviert werden. Diese Gene kodieren Proteine, die wiederum an den EGFR binden und die Wirkung des aktivierten EGFR

supprimieren. Diese Signalstoffe werden *Inducible Feedback Inhibitor* (IFI) genannt. Bisher sind 4 IFIs bekannt: LRIG1, RALT sowie SOCS4- und 5 [64].

Nach Ligandenbindung und Dimerisierung kommt es zur Internalisierung des EGFR, der sogenannten Liganden-induzierten Endozytose, an Clathrin-coated pits. Im Gegensatz zu allen anderen beschriebenen Rezeptortyrosinkinasen gelangt der EGFR/Ligand-Komplex größtenteils in Lysosomen und wird dort rasch abgebaut. Dieser Mechanismus senkt die Zahl der oberflächlichen Rezeptoren. Offenbar unterliegt dieser Mechanismus einer Sättigungskinetik und tritt nur bei gebundenem EGF auf, d. h. bei einer hohen Anzahl von Rezeptoren werden einige nur noch deutlich langsamer abgebaut [61]. Außerdem führt die Bindung von TGF-α an einem EGFR/HER2-Heterodimer zum Recycling des Rezeptors, sodass deutlich stärkere Signale ausgelöst werden. Die Ubiquitin-Protein-Ligase c-Cbl führt über Ubiquitinylierung zum Abbau des Rezeptors. Die Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung von Threoninresten verhindert dagegen den Rezeptorabbau, schwächt jedoch die Signalwirkung ab. Mechanismen der Internalisierung über Pinozytose oder *Caveolae* wurden ebenfalls beschrieben [61,62].

Neben der Rolle des EGFR als membranständiger Rezeptor wurde dieser auch im Zellkern verschiedener Gewebe, besonders in Krebszelllinien, nachgewiesen. Die Exposition gegen Vitamin D, H_2O_2, Hitze, aber auch Bestrahlung und das Zytostatikum Cisplatin wurden als Auslöser für die Migration in den Zellkern beschrieben. Im Zellkern interagiert er mit Transkriptionsfaktoren wie E2FI oder STAT 3 und induziert die Transkription u. a. der induzierbaren Stickoxid-Synthetase (iNOS), DNS-abhängiger Proteinkinase oder Transkriptionsfaktoren wie B-Myb oder cyclin D1. Dies führt letztlich zu DNS-Reparatur, Proliferation oder Metastasierung von Tumoren [65].

Die Entdeckung dieser Second-Messenger-Wege, ebenso wie die Darstellung von Abweichungen derselben, hat die Onkologie revolutioniert. Mutationen des EGFR Rezeptors ebenso wie Überexpression, Amplifizierung, (Dauer-)Aktivierung oder autokrine Aktivierungsschleifen sind in die Kanzerogenese involviert. Der EGF-Rezeptorstatus ist ein wichtiger Marker für die Prognose von Krebserkrankungen geworden. Der EGFR wurde in einer Vielzahl von Tumoren wie *Non-Small-Cell-Lung Cancer*, Brust- Pankreas-, Magen-Kolon und Ovarialkarzinome, Gliomen, sowie Tumoren im Kopf/ Hals-Bereich nachgewiesen [60]. Über den monoklonalen Antikörper Trastuzumab kann die extrazelluläre Domäne des EGFR/HER2 Heterodimers inhibiert werden. Die Bindung eines Liganden führt dabei nicht mehr zu einer Signaltransduktion, das Rezeptorheterodimer ist inaktiviert. Die Antikörper Cetuximab und Panitumumab hemmen die extrazelluläre Domäne des EGFR, Erlortinib und Gefitinib die Rezeptortyrosinkinase. Auch dies führt letztlich zu einer Inaktivierung des Rezeptors. Weitere Mechanismen der Hemmung wie Liganden-Toxin-Fusionsproteine oder

Antisense-Oligonukleotide gegen den EGFR, befinden sich im Zustand der Entwicklung [60,61].

Neben den eben beschriebenen Wirkungen kann der EGFR auch als heterologer Signaltransduktor für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Integrine, Zytokinrezeptoren, Ionenkanäle und andere Rezeptortyrosinkinasen dienen. Diesen Vorgang nennt man Transaktivierung. Dabei ist keine Bindung eines Liganden notwendig. Dieser Prozess kann durch einen hyperosmolaren Schock, UV- und Gammastrahlung, reaktive Sauerstoffspezies und Membran-depolarisierende Agentien geschehen. Dieser Vorgang zeigt eine schnelle Kinetik, ist nur vorübergehend und abhängig von der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors. So ist über Transaktivierung des EGFR durch Angiotensin II, Endothelin-1 oder Lysophosphatidylsäure eine Aktivierung von ERK 1/2, c-Jun N-terminale Kinase (JNK) 1/2 oder von c-Fos möglich [51,66,61]. Mittels Spironolacton ist dieser Prozess antagonisierbar [51]. Der mit Aldosteron aktivierte Mineralokortikoidrezeptor kann über c-Src ebenfalls den EGFR transaktivieren. Dieser Prozess gehört zu den schnellen, non-genotropen Effekten von Aldosteron (siehe 1.1.8) [49].

1.3 Zielsetzung

In den Studien RALES und EPHESUS wurde für Patienten mit Herzinsuffizienz ein dramatisches Absinken von Morbidität und Mortalität beobachtet, wenn sie Aldosteronantagonisten erhielten [43,44]. Zur Erklärung dieses Sachverhalts rückte, neben den in Kapitel 1.1.7 und 1.1.8 geschilderten Mechanismen, die Rolle des EGFR in den Blickpunkt wissenschaftlichen Interesses.

Im Jahr 2003 konnte gezeigt werden, dass Aldosteron die EGFR-Expression steigert. Dieser Effekt erforderte den MR, ließ sich nicht über den GR auslösen und konnte durch Spironolacton gehemmt werden [67].

2007 erfolgte der Nachweis, dass eine gesteigerte EGFR-Expression nicht durch Dexamethason induzierbar war. In dem 1118 Basenpaare umfassenden Promotor des EGF-Rezeptors konnten zwei Regionen identifiziert werden, mit denen der mit Aldosteron aktivierte MR funktionell interagiert [68,69].

Einleitung

MRE1(1) (153 bp)

CGCCTGGTCCCTCCTCCTCCCGCCCTGCCTCCCCGCGCCTCGGCCCGC
GCGAGCTAGACGTCCGGGCAGCCCCCGGCGCAGCGCGGCCGCAGCA
GCCTCCTCCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGCCGCGGCCGAGGCGGC
CGGAGTCCCGAG

MRE 2 (163 bp)

CTAGCCCCGGCGGCCGCCGCCGCCCAGACCGGACGACAGGCCACCT
CGTCGGCGTCCGCCCGAGTCCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCA
CCGCGCACGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTGATCGGGAGAGCCGGA
GCG

Abb. 6 Sequenz der beiden Promotorregionen

Ziel dieser Arbeit war es nun, die Interaktionsdomäne auf diesen beiden DNS-Fragmenten weiter zu charakterisieren. Dabei sollte ermittelt werden, ob dieser DNS-Abschnitt, mit denen der MR interagiert, ebenso eine Struktur aus zwei Halbpalindromen enthält, wie in 1.1.5 beschrieben. Die Aufklärung dieser Struktur würde zur Entdeckung des ersten spezifischen Mineralokortikoid Responsiven Elements führen. Eine genaue Charakterisierung des MRE würde die Suche nach weiteren Mineralokortikoid-Responsiven Elementen in den Sequenzen anderer Gene ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Biomaterialien

Chemikalien	
Acrylamid, 40 %	BioRad
Agarose	PEQGold Universal Agarose, PEQLAB
Ampicillin	Roth
APS	FluKa Chemie AG
AttoPhos Reagenz	Promega, 2‘[2-benzothiazoyl]6’hydroxybenzo-thiazolphosphat
BCA Reagens A	Thermo Fisher Scientific
BCA Reagens B	Thermo Fisher Scientific
Bisacrylamid	Amresco
Borat	Sigma/ Merck
Cleavage-Buffer	2,76g NaH_2PO_4*H_20, Na_2HPO_4*$2H_2O$ 5,34g, KCL 50 ml 0,37g, $MgSO_4$ 0,12g je 50 ml destilliertes Wasser
EDTA	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Serva
Essigsäure	Sigma
KCl	Sigma/ Serva/ Merck
Kanamycin	Roth
$MgSO_4$	Sigma/ Merck
Methionin	Sigma, 1 mM
MOPS	Merck
Natriumbikarbonat	Sigma
NaCl	Sigma, Sigma-Aldrich, Sigma, Merck, Fluka, Roth
Nuklease freies Wasser	Sigma, DNAse- und RNAse frei
ONPG	Sigma/ Invitrogen, und o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
o-Phenylendiamin	Sigma
TBE	108g/l Trizma Base, 55g/l Borat, 40 ml EDTA (0,5 M pH8)
TEMED	Sigma

Material und Methoden

TRIS	Serva/ Merck
Triton	Serva/ Sigma
Trypsin	Sigma
T4-DNA-Ligase	Invitrogen

Hormone

Aldosteron	Sigma, FluKa Chemie AG, gelöst in DMSO
Dexamethason	Sigma

Kits

Reporter Gene Assay Kit	Qiagen
Präparartionskit für Plasmidherstellung	Qiagen/ Invitek

Nährmedien

FKS	PAA
LB-Agar	10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Tryptone, 1 N 1 ml NaOH auf 1 l, pH 7
MEM	Earle's Salts mit L-glutamin und 10% FKS, PAA
SOC	5g Hefeextrakt, 20 g Tryptone, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 20mM $MgSO_4$, 20 mM Glukose pro Liter

Plasmide

EGFR	Calbiochem, rekombinant, E.coli
EGFP-hMR	Dr. Farman, Inserm, Paris
pcDNA 3.1/His/lacZ	Invitrogen
pCR2.1 Vektor	Invitrogen
pSEAP2-Basic Vektor	Clontech
pEGFP Vektor	Clontech
SEAP-GRE	Clontech

Puffer

DMSO	Sigma
Elutionsbuffer	pH 7,5, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl
Extraktionspuffer	20 mM HEPES, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF

Stop-Puffer	
Restriktionsenzyme/ DNS-Leitern	
BamHI	NEW ENGLAND BioLabs
BglII	NEW ENGLAND BioLabs
DNS-Leiter	PEQLAB Biotechnologie
DNS-Leiter	PEQLAB Biotechnologie
EcoRI	NEW ENGLAND BioLabs
NheI	NEW ENGLAND BioLabs
XhoI	NEW ENGLAND BioLabs
Zellen/ Bakterien	
OK	Dr. Biber, Physiologisches Institut der Universität Zürich
One Shot Competent cells Top F10, *Escherichia coli*	Invitrogen

2.2 Laborgeräte

Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments function line
Brutschrank	Heraeus Instruments Function Line BB 16, Thermo Scientific Hera Cell 150, Heraeus Instruments Hera Cell
Chemikalienabzug	Köttermann Typ 2-418
Floureszenzmikroskop	Biozero KEYENCE
Floureszenzspektrometer	Tecan infinite
Heizblock	TS-100 Thermo Shaker
Horizontalschüttler	Heidolph Polymax 1040, Heidolph Duomax 1030
Laminar Air Flow	Heraeus Instruments Hera Safe HS 12/2, KOJAIR Biowizard
Lichtmikroskop	Leitz Labowert Type 090-122.012
Mikrozentrifuge	VWR Galaxy Mini, Model MC-6400 Centrifuge
Photometer	Tecan sunrise
Reagenzglasschüttler	Environmental Shaker ES-20

Spannungsquelle	CONSORT E 835
UV-Vis Spektrometer	Berthold Technologies Lumat LB 9507
Waage	Faust FA-110-4i
Zentrifuge	Hermle Z 200 M4, Beckamnn CS-15R Centrifuge, Thermo Scientific Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Jouan MR 1812, Thermo Elektron Corporation Heraeus Multifuge 1S-R Centrifuge

2.3 Reporter gene Assay

2.3.1 Plasmide

Das verwendete Plasmid für die Herstellung von den Promotorkonstrukten ist der pSEAP2-Basic Vektor von Clontech, welcher in folgenden Abbildung (Abb. 7) dargestellt ist. In die Multiple Cloning Site genannte Sequenz (in der Abbildung mit "MCS" abgekürzt) werden die benötigten DNS-Sequenzen eingefügt. Der Vektor enthält einen synthetischen Transkriptionsblocker (TB, siehe Abb.), dass die Hintergrundtranskription senkt. Das Fehlen von Promotor- und Enhancersequenzen dient dem selben Zweck. Ein Resistenzgen gegen Ampicillin ermöglicht eine Selektion von Bakterien, die nicht das Plasmid enthalten (Clontech, vgl. http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=10448, 15.10.2009).

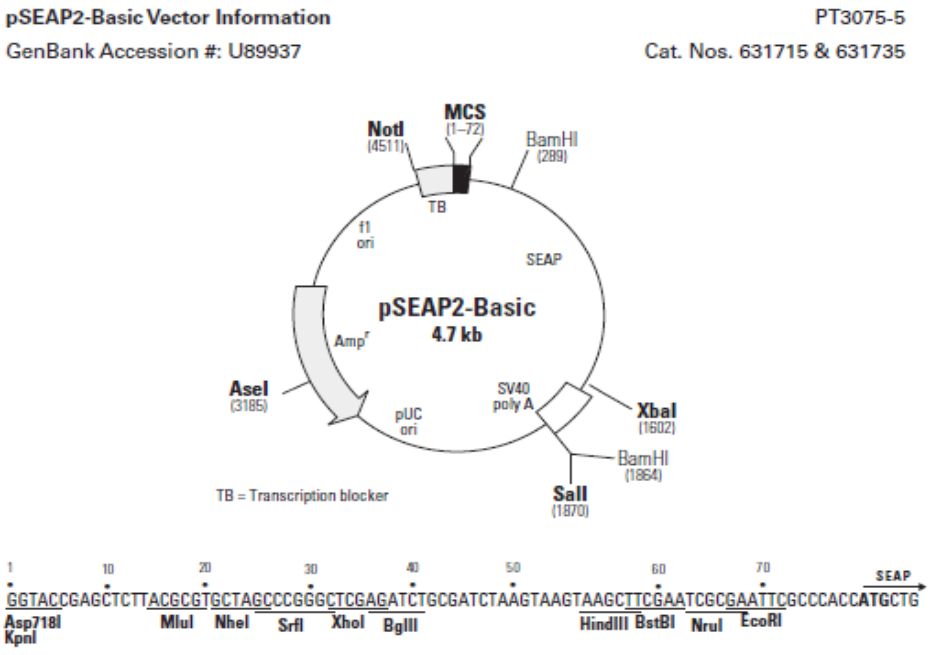

Abb. 7 Der verwendete Vektor pSEAP2-Basic

Material und Methoden

Der zur Herstellung von EGFP-hMR Plasmiden genutzte Vektor ist der pEGFP, ebenfalls von Clontech. In dem Vektor sind Gene zur Resistenz gegen Neomycin und Kanamycin enthalten, welches die Selektion von transformierten Bakterien ermöglicht (Clontech, vgl. http://www.clontech.com/images/pt/dis_vectors/PT3078-5.pdf, 21. 10 2009, Siehe Abb. 8)

Ein weiteres Plasmid zur Herstellung von Promotorkonstrukten ist der der Vektor pCR2.1 (Siehe Abb. 9). Der Vektor enthält die gleichen Gene zur Antibiotikaresistenz wie der Vektor pEGFP. Invitrogen, vgl. https://www.lablife.org/ct?f=c&a=showvecinfo&vectorid=5598, 03.11.2009).

Ein darüber hinaus verwendetes Plasmid ist der Vektor pcDNA 3.1/His/lacZ (Siehe Abb. 10). Der Vektor enthält die Gene zur Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin und Neomycin. (Invitrogen, vgl. http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcdna3_1hislacz_map.pdf, 15.04.2012)

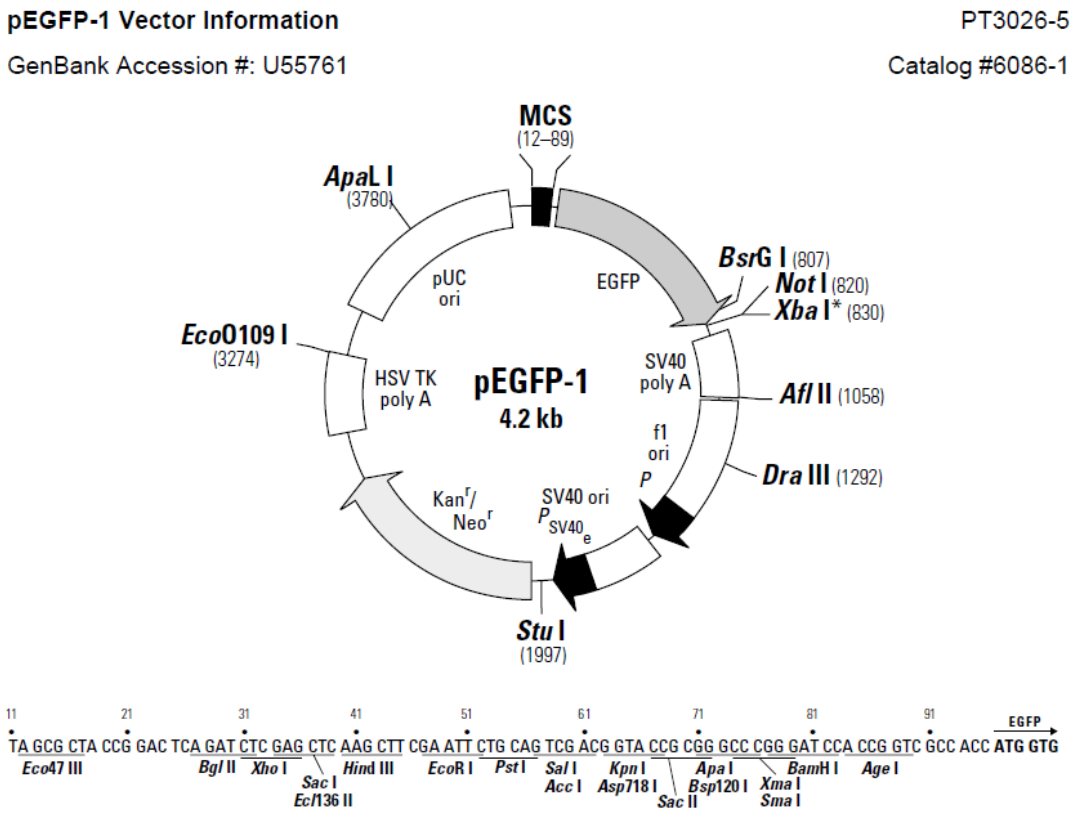

Abb. 8 Der verwendete Vektor pEGFP-1

Material und Methoden

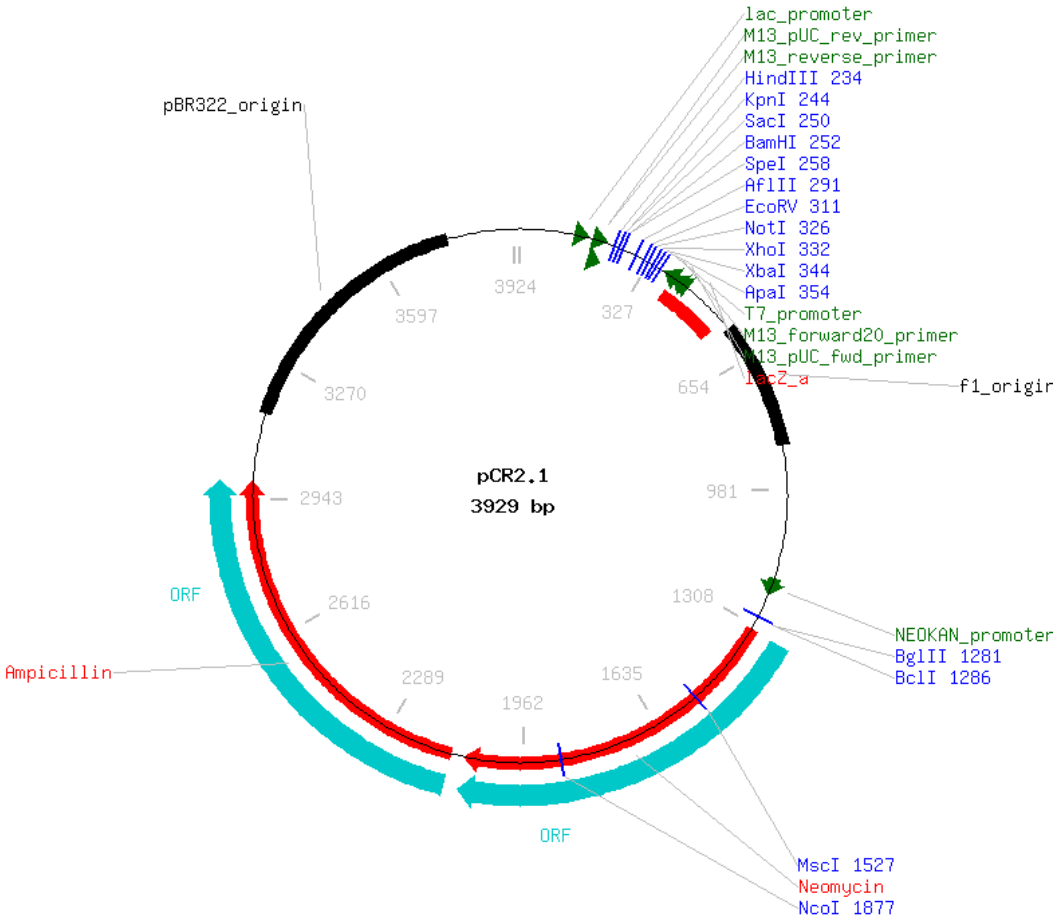

Abb. 9 Der verwendete Vektor pCR2.1

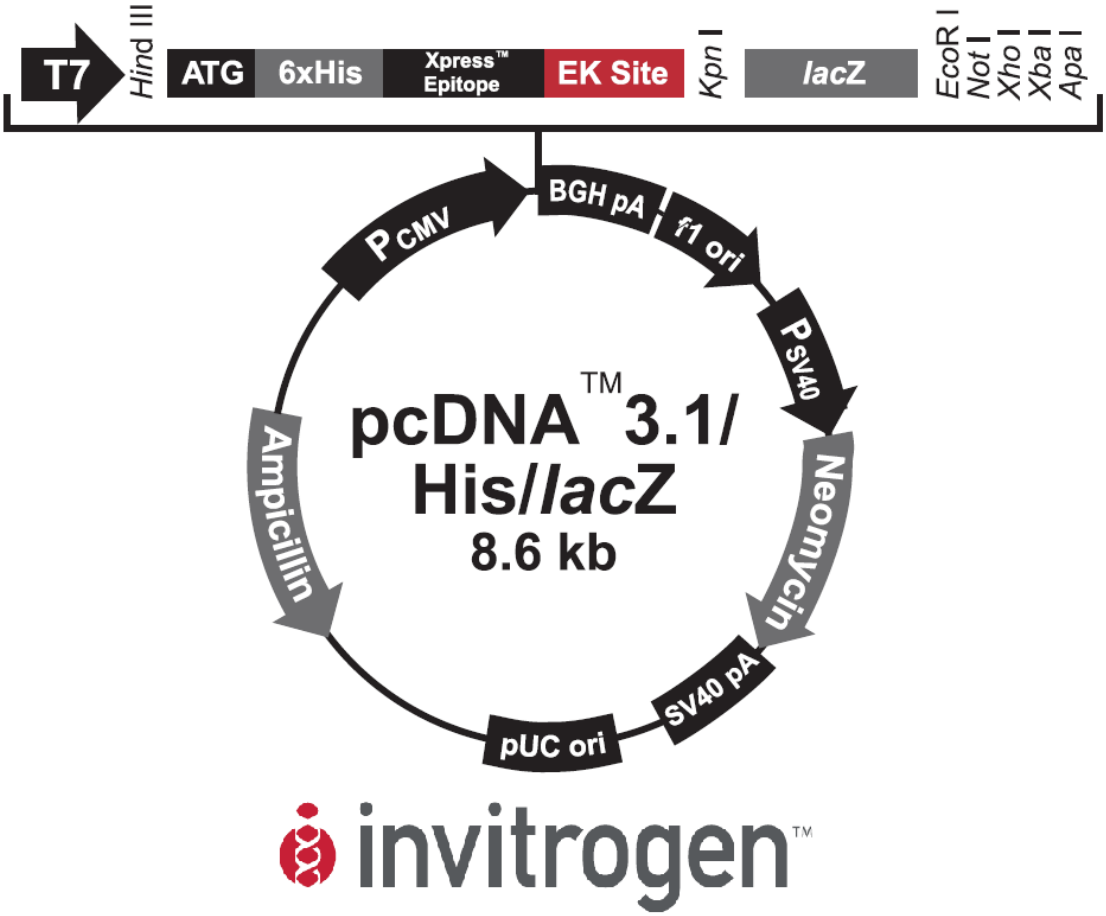

Abb. 10 Der verwendete Vektor pcDNA 3.1/His/lacZ

2.3.2 Plasmidherstellung

Zur Gewinnung der Plasmide werden Escherichia coli vom Typ Top F10 von Invitrogen eingesetzt. Die Bakterien werden in Luria-Bertani-Medium (LB-Agar) angezüchtet und mit dem gewünschten Plasmid und einem Antibiotikum über Nacht im Horizontalschüttler bei 37 °C inkubiert. Bei den Plasmiden LacZ und den Promotor-Konstrukten kommt dabei Ampicillin zum Einsatz, bei den EGFP-hMR und EGFP-Konstrukten Kanamycin.

Zur Herstellung der die gewünschten DNS-Sequenzen enthaltenden Plasmide werden dabei die Präparationkits von Qiagen und Invitek verwendet. Diese beruhen auf folgendem Prinzip:

Nach der Inkubation werden die Bakterienzellen mittels spezieller Puffer lysiert. Durch das Zentrifugieren und die Gabe weiterer Puffer werden die Proteine und andere Zellbestandteile nacheinander ausgefällt, abzentrifugiert und können verworfen werden. Schließlich werden die in den Bakterien enthaltenen Plasmide an Säulchen, die spezielle Filter enthalten, adsorbiert und mittels Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die Konzentration der Plasmide wird mittels UV/Vis photometrisch bestimmt.

2.3.3 Transfektion

In der Zellstudie werden Nierenzellen des Opossums (OK), bereitgestellt von Dr. Biber, Physiologisches Institut der Universität Zürich, verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Minimum Essential Medium (MEM) mit *Earle's Salts* mit L-Glutamin und 10-prozentigem fetalem Kälberserum (FKS). Die Zellen werden wöchentlich unter Verwendung von 0,2–prozentigem EDTA und 0,1-prozentigem Trypsin, passagiert.

Zur Transfektion wird ein Kit von Qiagen angewendet. Durch den verwendeten Puffer und *Enhancer* kondensiert die DNA der Plasmide, durch Effektene entstehen schließlich Mizellen, die durch die Plasmamembran der OK-Zellen gelangen.

Die Zellen werden in 24-Well-Schalen angesät. Mit Hilfe der Transfektion erhalten die Zellen jeweils drei Plasmide:

1. Das *Enhanced Green Fluorescence Protein* mit humanem Mineralokortikoidrezeptor (EGFP-hMR) bzw. EGFP als Negativkontrolle.
2. Den jeweils zu untersuchenden Abschnitt des EGFR-Promotors oder ein Leervektor als Negativkontrolle. Jeder Abschnitt des EGFR-Promotors ist mit dem Enzym sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) verknüpft, dessen Aktivität mittels Fluoreszenzphotometrie bestimmt werden kann.
3. Das konstitutiv exprimierte bakterielle Gen LacZ. Dies kodiert das Enzym β-Galaktosidase. Die Aktivität des Enzyms kann gemessen werden (siehe unten) und dient so als Transfektionskontrolle.

Zur Transfektion kommt Medium ohne FKS zur Anwendung.

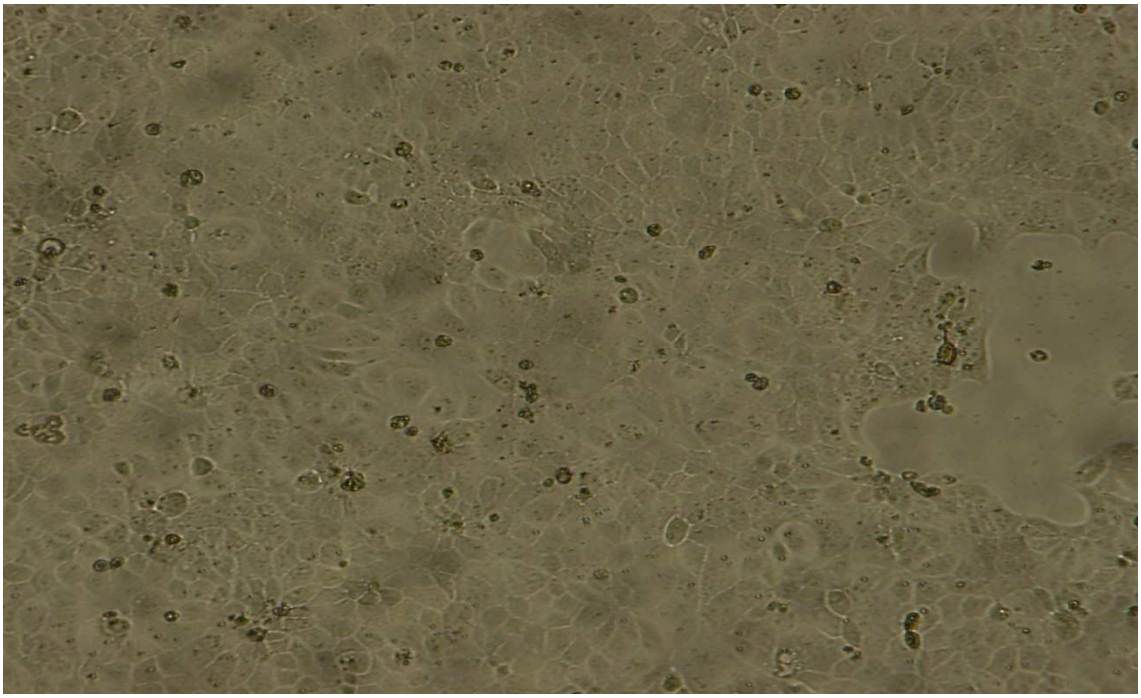

Abb. 11 Lichtmikroskopische Darstellung der Opossum-Nierenzellen (OK).

Material und Methoden

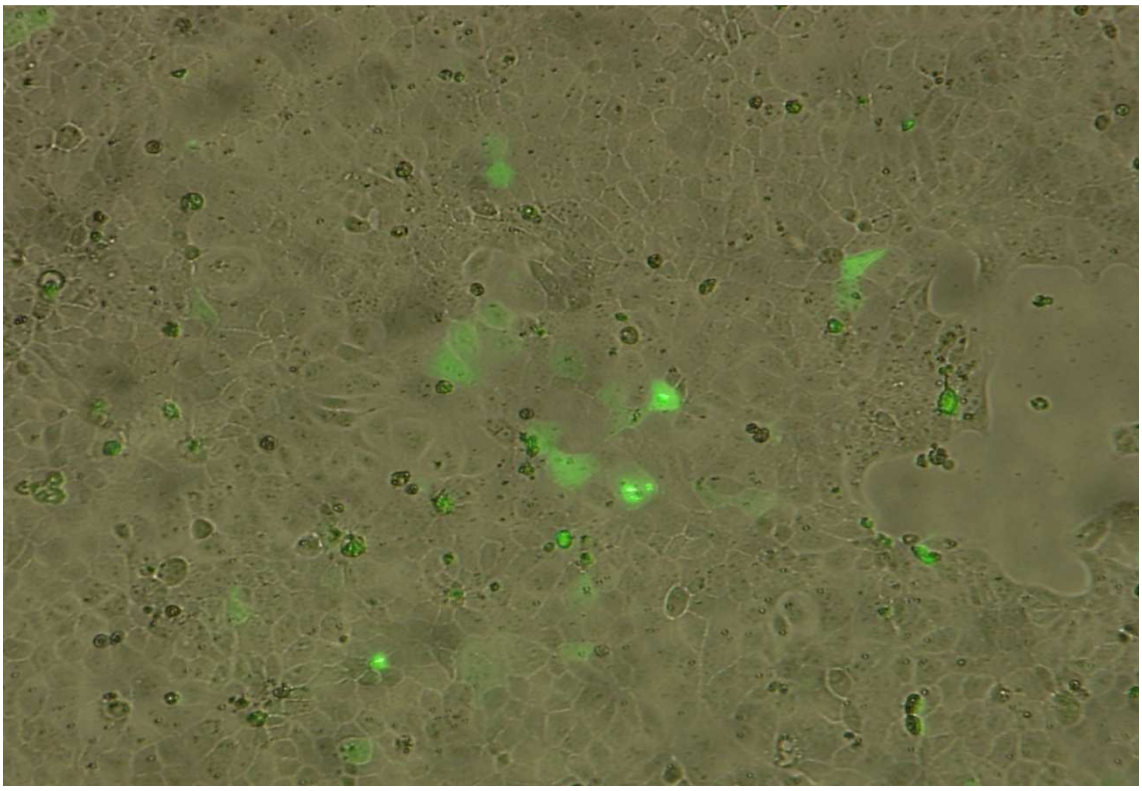

Abb. 12 Durch Überlagerung mit dem fluoreszenzmikroskopischen Bild werden die mit EGFP-hMR transfizierten Zellen grün wiedergegeben.

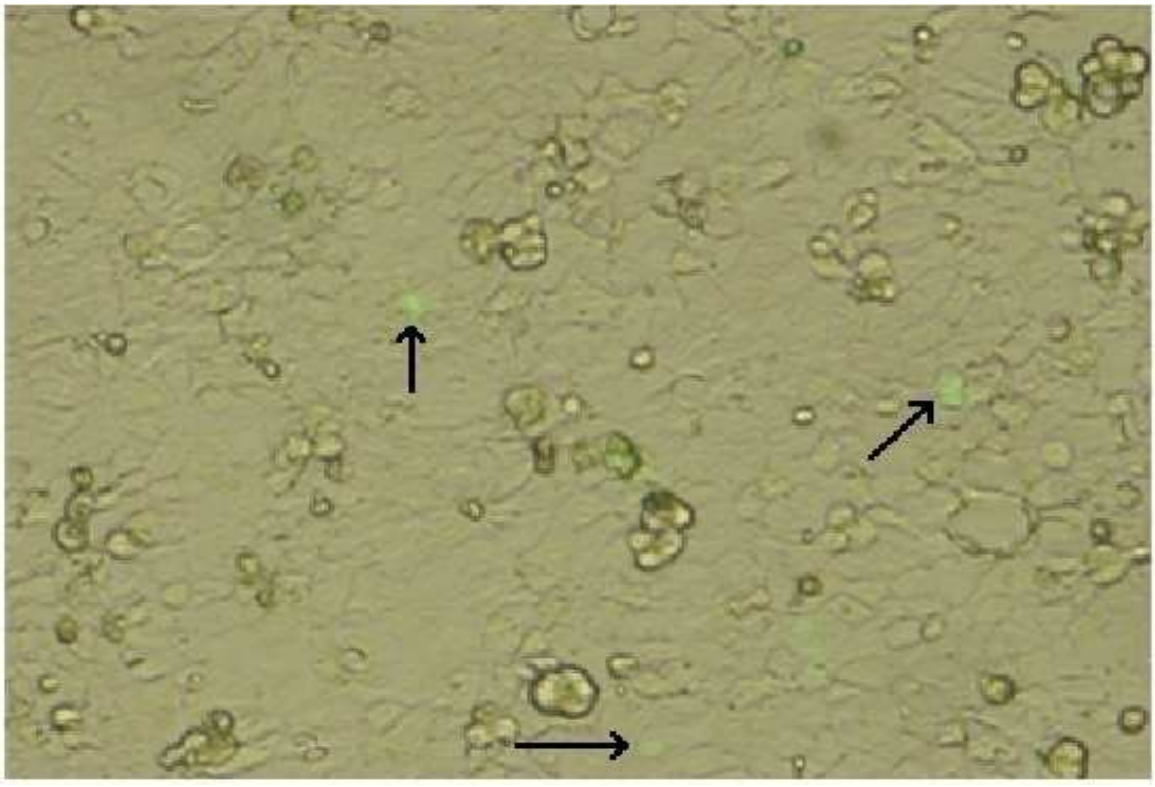

Abb.13 Infolge der Bindung von Aldosteron an den hMR werden diese in Zellkern der Zellen transportiert, der daraufhin grün fluoresziert. (siehe Pfeile)

Pro Versuchsansatz werden einige Wells nur scheintransfiziert, d.h. ohne zugeführte Plasmide. Durch die Messung der SEAP-Aktivität dieser Wells kann die Aktivität der natürlich in diesen Zellen vorhandenen, endogen alkalischen Phosphatase von der künstlich zugeführten subtrahiert werden.

In einem später verfolgten Ansatz werden die Zellen erst in Petrischalen ausgesät und transfiziert, nach 24 Stunden werden sie dann in eine 24-Well-Schale mit MEM-Medium mit FKS passagiert. Nach weiteren 24 Stunden erfolgt der Mediumwechsel auf MEM-Medium ohne FKS.

Durch das EGFP zeigen die so transfizierten Zellen eine Fluoreszenz im grünen Anteil des sichtbaren Lichts (bei 509 nm) (siehe Abb. 12). Nach der Transfektion werden die Zellen bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert.

2.3.4 Inkubation

Die Inkubation der Zellen erfolgt 24 Stunden nach der Transfektion mit 10 nM Aldosteron, gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO). Pro Ansatz wird jeweils die Hälfte der Wells der zu untersuchenden MRE-Sequenzen stimuliert. Dadurch gelangt der aktivierte Mineralokortikoidrezeptor aus dem Zytosol in den Zellkern. Folglich weisen nur noch die Nuklei Fluoreszenz im grünen Farbspektrum auf (siehe Abb. 13). Das verwendete Medium enthält kein FKS. Die anderen Wells erhalten lediglich eine DMSO-Lösung, das sogenannte Vehikel.

2.3.5 Fluoreszenzmessung

Nach 48 Stunden erfolgt die Quantifizierung der SEAP Reporter-Gen-Aktivität im Medium. Dabei reagiert Atto Phos Reagens von Promega in Anwesenheit der alkalische Phosphatase. Unter Phosphatabspaltung entsteht ein fluoreszierender Alkohol, der bei 435 nm einen Emissionspeak aufweist. Die Fluoreszenz wird im Zeitverlauf im Tecan infinite ermittelt.

Nach der vollständigen Entfernung des MEM-Mediums werden die Zellen mittels MOPS/ Triton im Horizontalschüttler für 30 Minuten lysiert und anschließend bei 4 °C für 10 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand dient zur Durchführung des β-Galaktosidase-Assay und des Bicinchoninsäureassays.

2.3.6 β-Galaktosidase-Assay

Mit dem β-Galaktosidase-Assay (β-gal) kann die Aktivität des Enzyms β-Galaktosidase bestimmt werden. Dieses Enzym ist im bakteriellen Gen LacZ codiert und katalysiert die Hydrolyse von β-D-Galaktopyranosiden unter Abspaltung von Galaktose.

Zur Probenbestimmung werden *Cleavage-Buffer*, Zelllysat der Probe und ONPG eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 N Natriumbikarbonat gestoppt. Die Proben weisen durch das entstehende o-Nitrophenyl eine gelbliche Färbung auf, dessen Absorption im Photometer Tecan Sunrise bei 420 nm gemessen werden kann.

2.3.7 Bicinchoninsäureassay

Der Bicinchoninsäureassay (BCA) dient der quantitativen Bestimmung des Proteingehalts des Zelllysats. In einer Biuretreaktion werden dabei Kupfer-(II)-Ionen durch die Seitenketten basischer Aminosäuren zu Kupfer-(I)-Ionen reduziert. Diese Ionen reagieren mit der BCA-Reagens zu einem Kupfer-(I)-BCA-Chelatkomplex, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann.

Bei der Untersuchung wird BCA Reagens A von Thermo Fisher Scientific mit BCA Reagens B (4-prozentiges Kupfer-(II)-sulfat) im Verhältnis 50:1 gemischt. Die grüne Substanz wird auf die zu untersuchenden Proben des Zelllysats in einer unbeschichteten 96-Well-Schale gegeben. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 37 °C über 30 Minuten. Eine dunkle Verfärbung indiziert eine positive Reaktion an. Die Proben werden photometrisch bei 562 nm im Tecan Sunrise analysiert. Über eine ebenfalls bestimmte Standardkurve von bovinem Serumalbumin (BSA) wird darauf der Proteingehalt quantifiziert.

2.4 Klonieren des MRE 2.1minus

Zur Generierung eines neuen Plasmids werden zuerst mittels PCR die benötigten Sequenzen synthetisiert. Anschließend werden durch Restriktionsendonukleasen das Plasmid pCR2.1 (Beschreibung siehe oben) spezifisch geschnitten und über eine Gelelektrophorese in dessen Fragmente aufgetrennt. In diesem Fall erfolgt der Restriktionsverdau des Plasmids mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI sowie mit Nuklease-freiem Wasser und Puffer von NEW ENGLAND BIOLABS bei 37 °C im Heizblock für 4 h. Anschließend wird das Fragment über 40-prozentiges PAGE-Gel (Polyacrylamidgelelektrophorese) über 2 Stunden bei 140 V die Restriktionsprodukte aufgetrennt. Nach Färben mit Ethidiumbromid und Waschen, werden unter UV-Licht die Banden sichtbar. Diese werden mechanisch aus dem Gel entfernt, mit Elutionsbuffer (pH 7,5, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) Schüttler bei Raumtemperatur über 8 Stunden inkubiert. Durch das Zentrifugieren für eine Minute in der Mikrozentrifuge wird das Gel pelletiert. Aus dem Überstand kann dann die DNS per Ethanol-Fällung gewonnen werden.

Dazu wird der Überstand erst mit 3-molarem Natriumacetat (pH 5,2), dann mit eiskaltem Ethanol gemischt und bei -20 °C über 12 Stunden ausgefällt. Daraufhin wird über zweimaliges

Zentrifugieren bei 13000 rpm bei 4 °C, Entfernung des Überstands und Waschen mit gekühltem 70-prozentigen Ethanol die DNS so konzentriert, dass diese nach Verdampfen der restlichen Flüssigkeit im Heizblock in Nuklease freiem Wasser wieder gelöst werden kann.

Darauf erfolgt eine weitere Restriktion analog der ersten mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BglII, dem Plasmid pSEAP-Basic, Puffer und Nuklease freiem Wasser. Im Anschluss daran wird der geschnittene pSEAP-Basic Vektor über Gelelektrophorese in 0,7-prozentigem Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Licht die Bande herausgetrennt und mit entsprechendem Puffer eluiert.

Nun kann fortfolgend mit dem Qiaquick-Gelextraktionskit das Plasmid gewonnen werden (Prozedere siehe oben).

In der Ligation werden schließlich das isolierte Plasmid pSEAP-Basic und die gewünschte Sequenz des EGFR-Teilkonstrukts aus dem pCR2.1 mittels T4-DNA-Ligase und T4-DNA-Ligasepuffer von Invitrogen The Original TA Cloning Kit verknüpft.

Das Plasmid kann nun in Bakterien transformiert werden. So ist es möglich, Plasmide zu amplifizieren. Dabei kommen Escherischia coli vom Typ *One Shot Competent cells* Top 10 von Invitrogen zur Anwendung. Dazu wird der Ligationsansatz zu den Bakterien gegeben und vorsichtig vermischt. Nach 30-minütigem Ruhen auf Eis werden sie für 30 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C inkubiert und erneut auf Eis gestellt. Folgend wird SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und diese bei 37 °C für eine h bei 225 rpm in den Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterien können jetzt auf LB-Agar mit Ampicillin oder Kanamycin, je nach Ansatz, ausplattiert werden. Nach 12-stündigem Wachstum der Bakterien im Brutschrank bei 37 °C können einzelne Bakterienkolonien isoliert und in LB-Agar über Nacht für die Plasmidherstellung vormehrt werden.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wird eine Testresektion durchgeführt. Der Ansatz ist bis auf die Restriktionsendonukleasen (hier EcoRI und NheI bzw. XhoI) und einem anderen Puffer gleich. Die Ergebnisse werden wiederum mittels einer PAGE aufgetrennt.

2.5 Statistik & Datenverarbeitung

Zur Bewertung der Ergebnisse wurden a-priori-Paarungen eingesetzt. Dabei wird der Quotient aus den Werten der mit Aldosteron stimulierten Wells und den Basalaktivitäten desselben Ansatzes gebildet. Werte höher als 1 belegen eine Stimulation, Werte kleiner als 1 eine Hemmung des jeweiligen Ansatzes.

Weiterhin kamen die Standardabweichung und der Standardfehler zur Anwendung. Außerdem wurde der T-Test nach Student verwendet. Dabei wurden Ergebnisse als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ ist. Dafür wurde Windows Excel 2007 genutzt. Die Diagramme wurden mit dem

SigmaPlot 8.0 erstellt. Zur Verwaltung der Zitate wurde der Reference-Manager 12 verwendet. Die Zeichnungen wurden mit Microsoft Paint und mit Paint.NET erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Das MRE 1

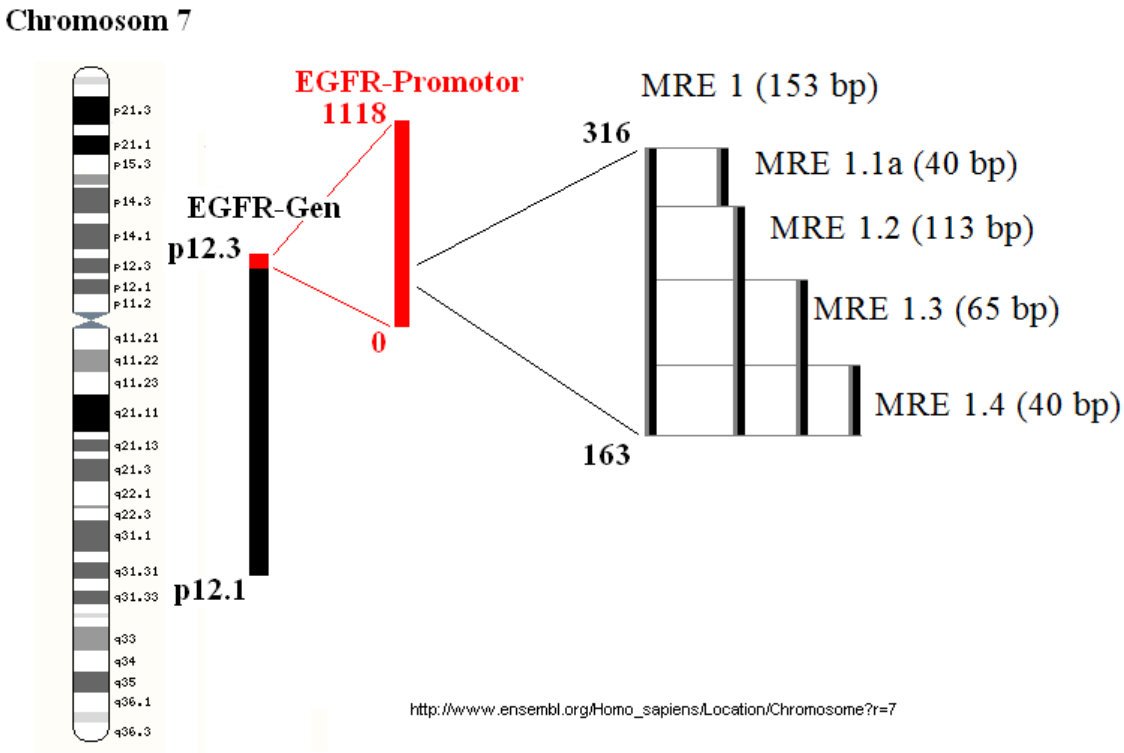

Abb. 14 Übersicht über den DNS-Abschnitt MRE 1 des EGFR-Promotors [70]

MRE1(1) (153 bp)

Sequenz: GCCTGGTCCCTCCTCCTCCCGCCCTGCCTCCCCGCGCCTCGGCCCGCGCGAGCTAGACGTC
==========MRE 1.1a==========
==========

Sequenz: CGGGCAGCCCCCGGCGCAGCGCGGCCGCAGCAGCCTCCTCCCCCCGCACGGTGTGAGCGC
==========
==========MRE 1.2==========
==========MRE 1.3==

Sequenz: CCGCCGCGGCCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAG
==========MRE 1.4==========
==========
==========

Abb. 15 Übersicht über die Sequenz des obigen DNS-Abschnitts

Ergebnisse

Der Promotor des EGF-Rezeptors umfasst 1118 Basenpaare. [71,72] Der zu untersuchende Abschnitt MRE 1 dieses Promotors umfasst 153 Basenpaare. Dieser ist in vier Promotorkonstrukte eingeteilt worden (siehe Abb. 14 und 15).

Der erste Abschnitt MRE 1.1a umfasst die ersten 40 Basenpaare. Sie sind nur in diesem Promotorkonstrukt enthalten. Die Konstrukte MRE 1.2, MRE 1.3 und MRE 1.4 sind nach absteigender Größe geordnet und überlappen sich teilweise. Der Abschnitt MRE 1.2 umfasst also mit 136 Basenpaaren eine 48 bp umfassende Sequenz, die nur in diesem Konstrukt vorkommt, und die DNS des Abschnitts MRE 1.3. Das Konstrukt MRE 1.3 ist entsprechend kürzer und beinhaltet 65, das MRE 1.4 40 Basenpaare.

Der SEAP-Basic enthält keinen Abschnitt des Promotors des EGFR und dient als Negativkontrolle, der Abschnitt MRE 1 als Positivkontrolle.

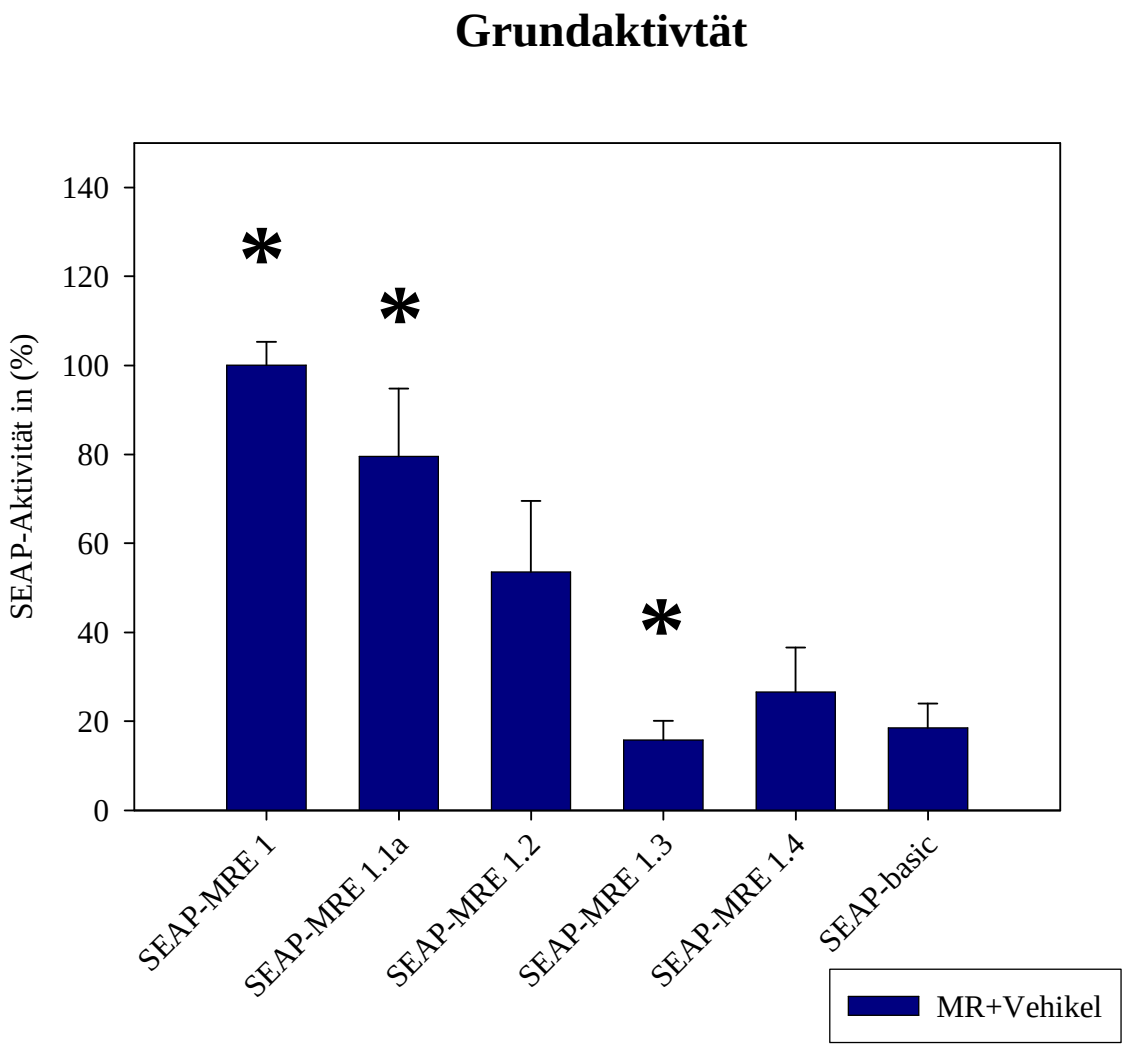

*Abb. 16 Übersicht über die basale Aktivität der Promotorkonstrukte des MRE 1, (n ≥ 13, n SEAP-Basic = 5, ***** bei p < 0,05 gegen SEAP-basic)*

Ergebnisse

Das obige Diagramm (Abb. 16) stellt die basale Aktivität der Promotorkonstrukte des MRE 1 dar. Dazu wurden OK-Zellen mit dem EGFP-hMR, dem entsprechendem Promotorkonstrukt und LacZ als Transfektionskontrolle transfiziert. Nach 24 Stunden werden die Zellen in Vehikellösung mit DMSO inkubiert, nach 48 Stunden erfolgt die fluoreszenzspektrometrische Messung der Aktivität der SEAP. (Die Vehikellösung dient zum Ausschluss einer Aktivität von DMSO, da Aldosteron in diesem gelöst ist) Zum Erhalt der obigen Daten wird der Quotient der Werte der Aktivität der SEAP und der Werte des β-Galaktosidase Assays gebildet. Aus Vergleichbarkeitsgründen wird die Probe mit dem SEAP-MRE 1 auf 100 % gesetzt und alle anderen Proben werden mit ihr verglichen. Zum Ausschluss endogener alkalischer Phosphataseaktivität wird der Mittelwert der SEAP-Aktivität der ohne Promotorkonstrukt transfizierten Wells pro Versuch von den übrigen Werten abgezogen. Auch die β-Galaktosidasewerte der nicht transfizierten Wells werden von den übrigen bestimmten Werten subtrahiert. Werte, die eine zu niedrige Aktivität des in dem β-Galaktosidase Assays bestimmten Gens LacZ haben, werden nicht gewertet.

Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass kein Promotorkonstrukt eine so hohe basale Aktivität aufweist wie der Abschnitt MRE 1 selbst. Die Aktivität im Vergleich zu MRE 1 nimmt von MRE 1.1a mit ca. 80 % über MRE 1.2 mit ungefähr 50 % auf MRE 1.3 mit ca. 15 % mit sinkender Länge der DNS-Sequenz ab. Das MRE 1.4 zeigt mit einer Länge von 40 bp eine SEAP-Aktivität von 25 % der Aktivität des MRE 1.

Ergebnisse

Aldosteronaktivität

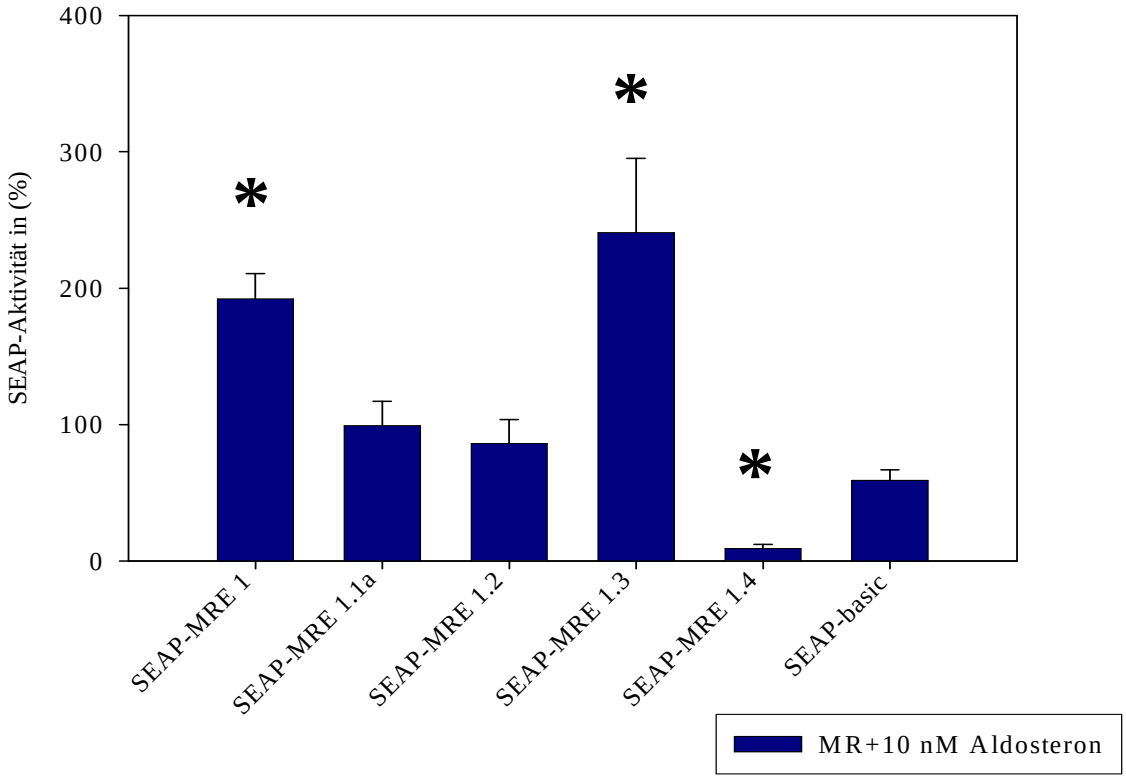

*Abb. 17 Übersicht über die Stimulierbarkeit der Promotorkonstrukte des MRE 1 mit Aldosteron, ($n \geq 12$, n SEAP-Basic = 5, * bei $p < 0,05$ gegen SEAP-basic, SEAP-MRE 1 mit MR und Vehikel =100 %)*

Das in Abbildung 17 dargestellte Diagramm zeigt die Stimulierbarkeit der Promotorkonstrukte des MRE 1 mit Aldosteron. Dazu erfolgt der selbige Versuchsaufbau, aber anstatt der Vehikellösung mit DMSO erhalten die 24 h nach der Transfektion die Wells 10 nM Aldosteron. Die Auswertung erfolgt wie beim obigen Ansatz nach 48 h.

Die Werte beziehen sich weiterhin auf die Aktivität der SEAP des MRE 1 mit Vehikel. Aus dem Diagramm wird deutlich, dass sich der MRE 1 mit Aldosteron auf 200% stimulieren lässt. Die Stimulation der Konstrukte MRE 1.1a und MRE 1.2 liegen etwas höher als ihre Basalaktivität, die des Abschnitts MRE 1.4 sogar niedriger. Das Promotorkonstrukt MRE 1.3 zeigt mit einer Aktivitätssteigerung auf rund 240 % eine höhere SEAP-Aktivität als MRE 1, die höchste Aktivität überhaupt. Die SEAP-Aktivität der Negativkontrolle SEAP-Basic beträgt ca. 50 % und liegt damit sogar höher als die des MRE 1.4, der unter Aldosteron sogar gehemmt zu werden scheint.

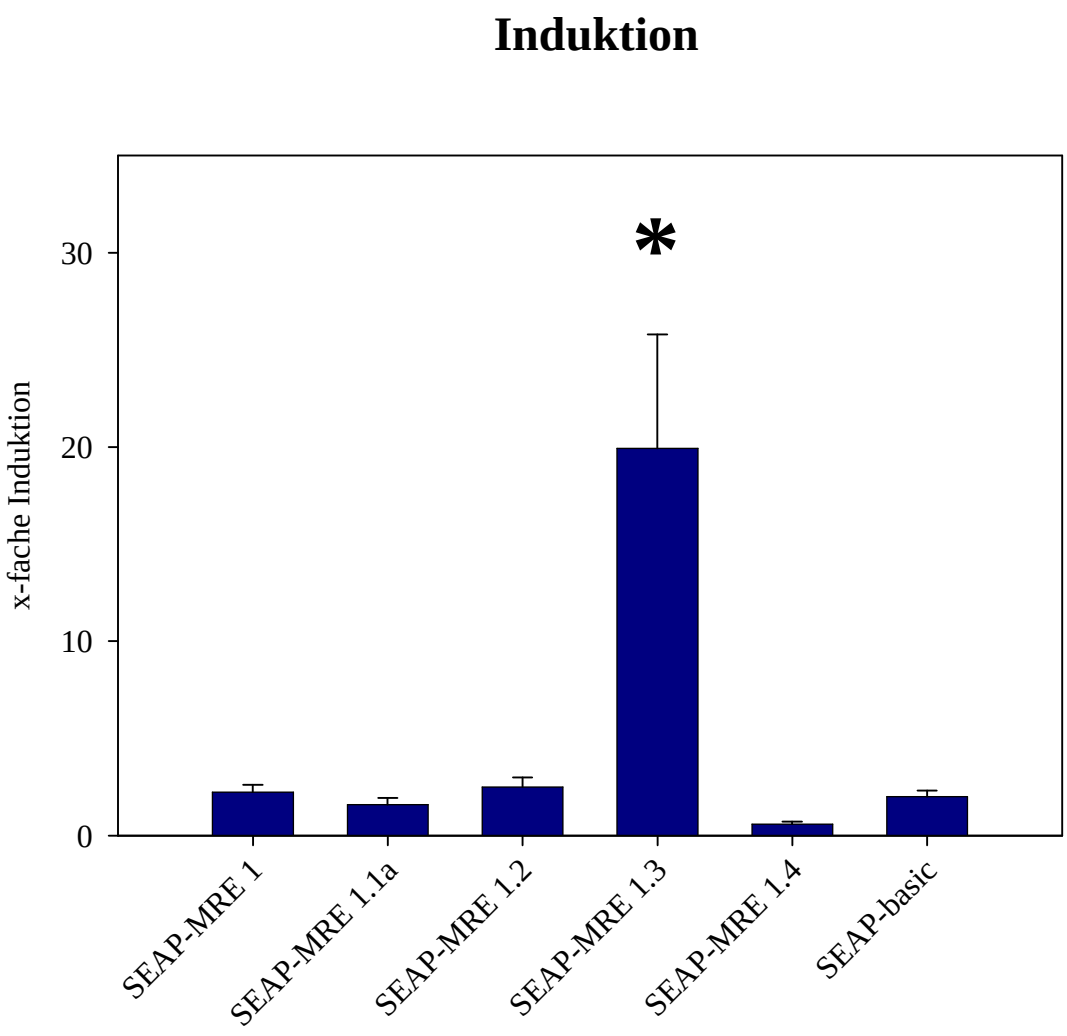

Abb. 18 Übersicht über die x-fache Induktion der Promotorkonstrukte des MRE 1, (n ≥ 13, n SEAP-Basic = 5, ***** *bei p < 0,05 gegen SEAP-basic)*

Aus den Werten der Diagramme der Abbildungen 16 und 17 wurde mit dem Quotient der Stimulierbarkeit unter Aldosteron, dividiert durch die Basalaktivität, die x-fache Induktion gebildet (Abb. 18). Aus diesem Diagramm wird ersichtlich, dass der Abschnitt MRE 1.2 mit Werten zwischen zwei und drei sich nur wenig durch Aldosteron stimulieren lässt. Auch die Stimulierbarkeit der Konstrukte MRE1, MRE 1.1a und SEAP-Basic ist niedrig, die des Abschnitts MRE 1.4 liegt sogar unter 1, d.h. die Basalwerte waren sogar höher als die Werte mit Aldosteron. Der Abschnitt MRE 1.3 zeigt mit einer ca. 20-fachen Induktion eine starke Stimulierbarkeit.

Ergebnisse

3.2 Das MRE 2

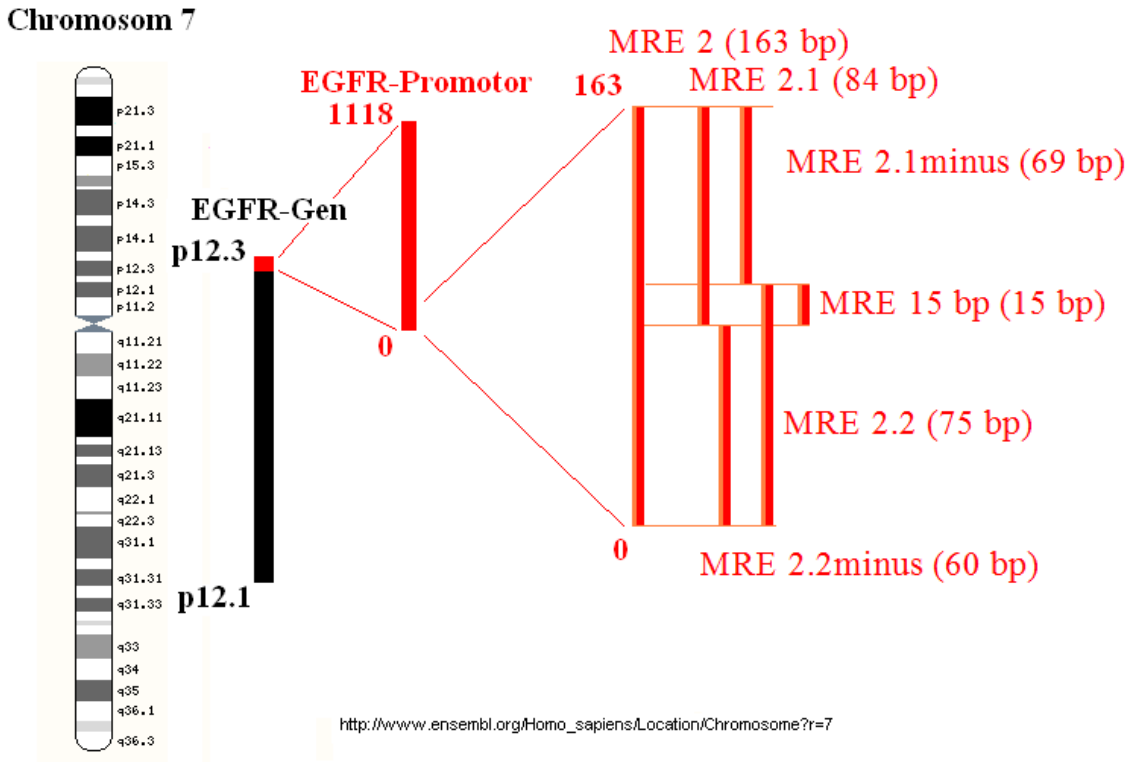

Abb. 19 Übersicht über den DNS-Abschnitt MRE 2 des EGFR-Promotors

MRE 2 (163 bp bzw. 144 bp)

Sequenz: CTAGCCCCGGCGGCCGCCGCCGCCCAGACCGGACGACAGGCCACCTCGTCGGCGTCCGCC
==========MRE 2.1minus ==========
==========MRE 2.1==========

Sequenz: CGAGTCCCCGCCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGCGCACGCCCCCTGACTCCGTCCAG
========== =====MRE 15 bp==== ==========MRE 2.2minus====
==========
==========MRE 2.2==========

Sequenz: TATTGATCGGGAGAGCCGGAGCG
==========
==========

Abb. 20 Übersicht über die Sequenz des obigen DNS-Abschnitts

Der Promotorabschnitt MRE 2 umfasst 163 Basenpaare im Promotor des EGF-Rezeptors. Er schließt sich direkt in 3' an das Fragment MRE 1 an. Das MRE 2 ist in drei, später fünf Abschnitte eingeteilt worden. Das Promotorkonstrukt MRE 2.1 umfasst 84 Basenpaare und

überlappt sich mit dem Abschnitt MRE 2.2 um 15 Basenpaare. Der Abschnitt MRE 2.2minus enthält dieselben Basenpaare wie der MRE 2.2, außer jenen 15 Basenpaaren (Abbildungen 19 und 20). Auch hier kommt der SEAP-Basic als Negativkontrolle zum Einsatz. Der Abschnitt MRE 2 dient hier als Positivkontrolle. Zusammen mit MR (also ohne Bindungsstelle für den hMR) entstehende Werte werden auf 100 % gesetzt.

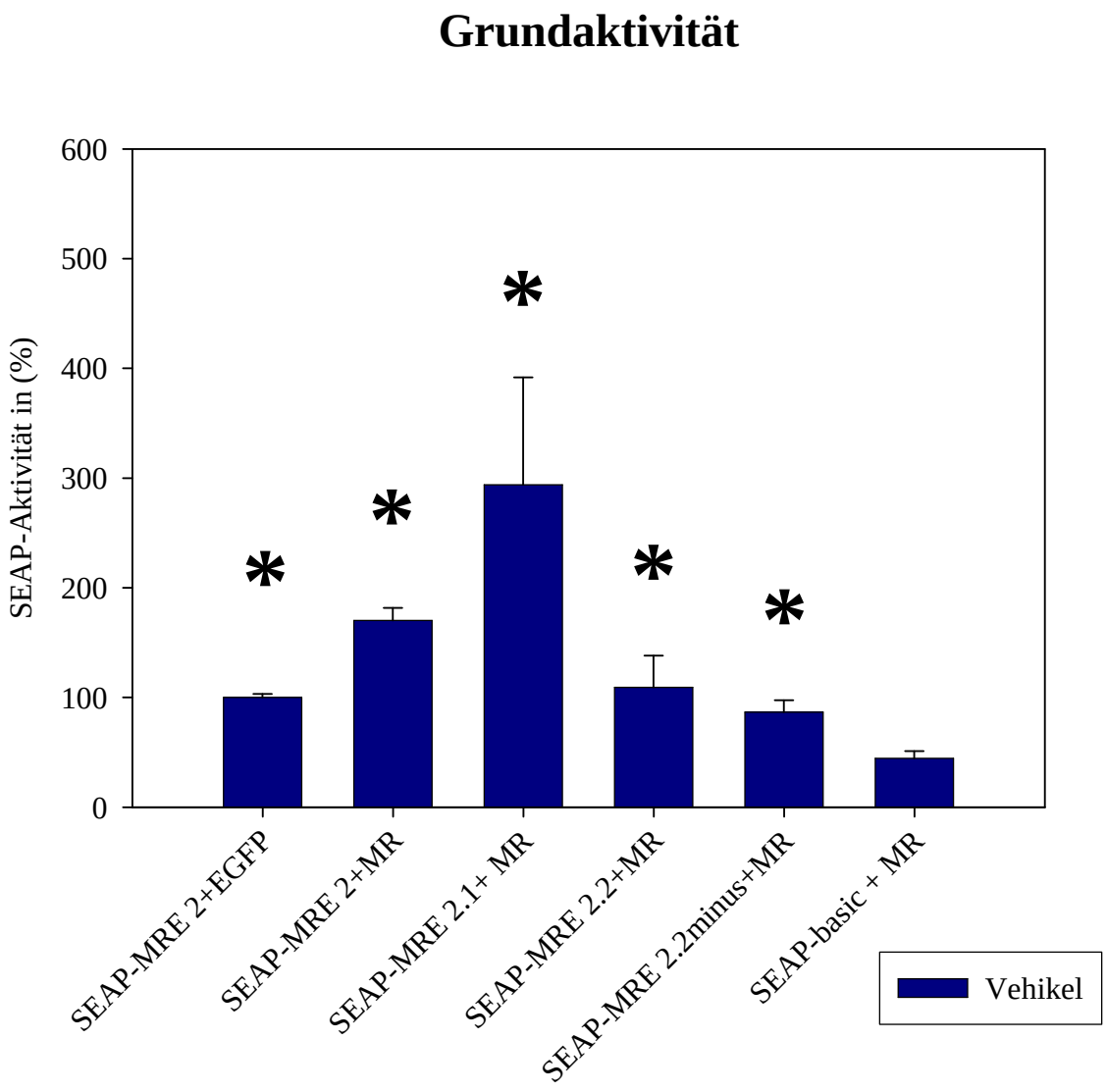

*Abb. 21 Übersicht über die Basalaktivität der Abschnitte des MRE 2 (n ≥ 29, ***** bei p < 0,05 gegen SEAP-basic)*

Für das Erstellen der Werte des obigen Diagramms (Abb. 21) gelten die selbigen experimentellen Bedingungen wie für die des Abschnitts MRE 1: OK Zellen werden mit EGFP-hMR, LacZ als Transfektionskontrolle und dem zu untersuchenden Promotorkonstrukt transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel mit der Zugabe von DMSO als Vehikellösung, nach weiteren 48 Stunden die Auswertung mittels Fluoreszenzmessung und der

β-Galaktosidase- und Bicinchoninsäureassay. Aus den Werten der SEAP-Aktivität und der β-Galaktosidasewerte wird der Quotient gebildet. Die Werte der Aktivität der SEAP von ohne Promotorkonstrukt transfizierten Wells werden von den anderen subtrahiert. Dies gilt ebenso für die β-Galaktosidasewerte dieser Wells. Sobald ein bestimmter Wert beim β-Galaktosidase Assay unterschritten wird, werden die Ergebnisse dieser Wells nicht gewertet. Die Werte der mit EGFP transfizierten Wells werden aus Vergleichbarkeitsgründen auf 100 % festgesetzt. Als Fehlerindikator dient der Standardfehler.

Auffällig bei diesem Diagramm ist die hohe Ruheaktivität des Abschnitts MRE 2. Ebenso wie im Abschnitt MRE 1 sinken die Ruheaktivitäten der Abschnitte mit sinkender DNS-Sequenzlänge. Die Werte der Negativkontrolle SEAP-Basic sind in diesem Diagramm am niedrigsten.

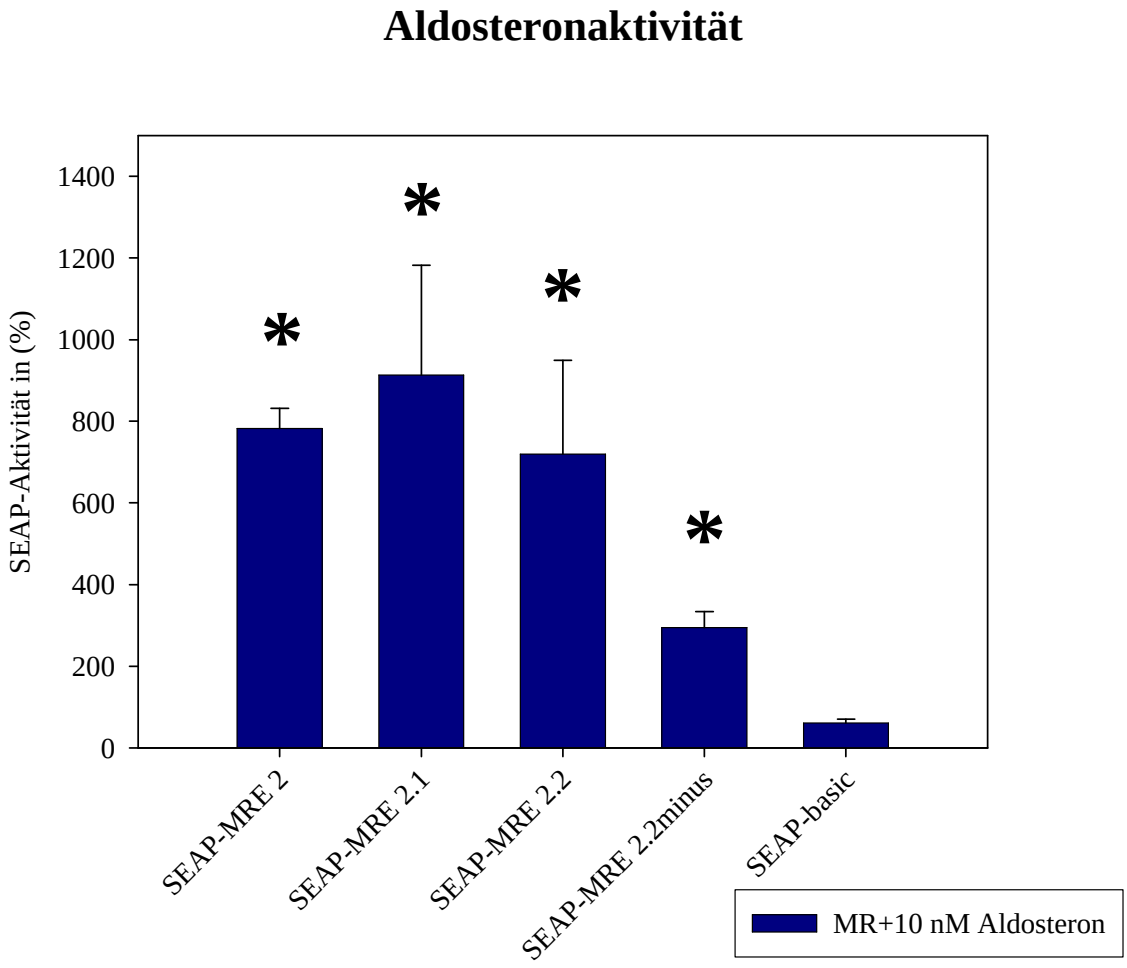

*Abb. 22 Übersicht über die Stimulierbarkeit der Abschnitte des MRE 2 unter Aldosteron (n ≥ 27, ***** bei p < 0,05 gegen SEAP-basic, SEAP-MRE 2 mit EGFP und Vehikel = 100%)*

Das Diagramm aus Abbildung 22 stellt die Stimulierbarkeit der MRE 2-Abschnitte unter 10 nM Aldosteron an Stelle der Vehikellösung dar. Diese Werte beziehen sich auf den EGFP-Wert als

100 %. Deutlich sichtbar ist die hohe Aktivität des Abschnitts MRE 2. Die Stimulierbarkeit der übrigen Abschnitte lässt mit sinkender DNS-Kettenlänge nach. Auch hier ist der Wert von SEAP-Basic am niedrigsten.

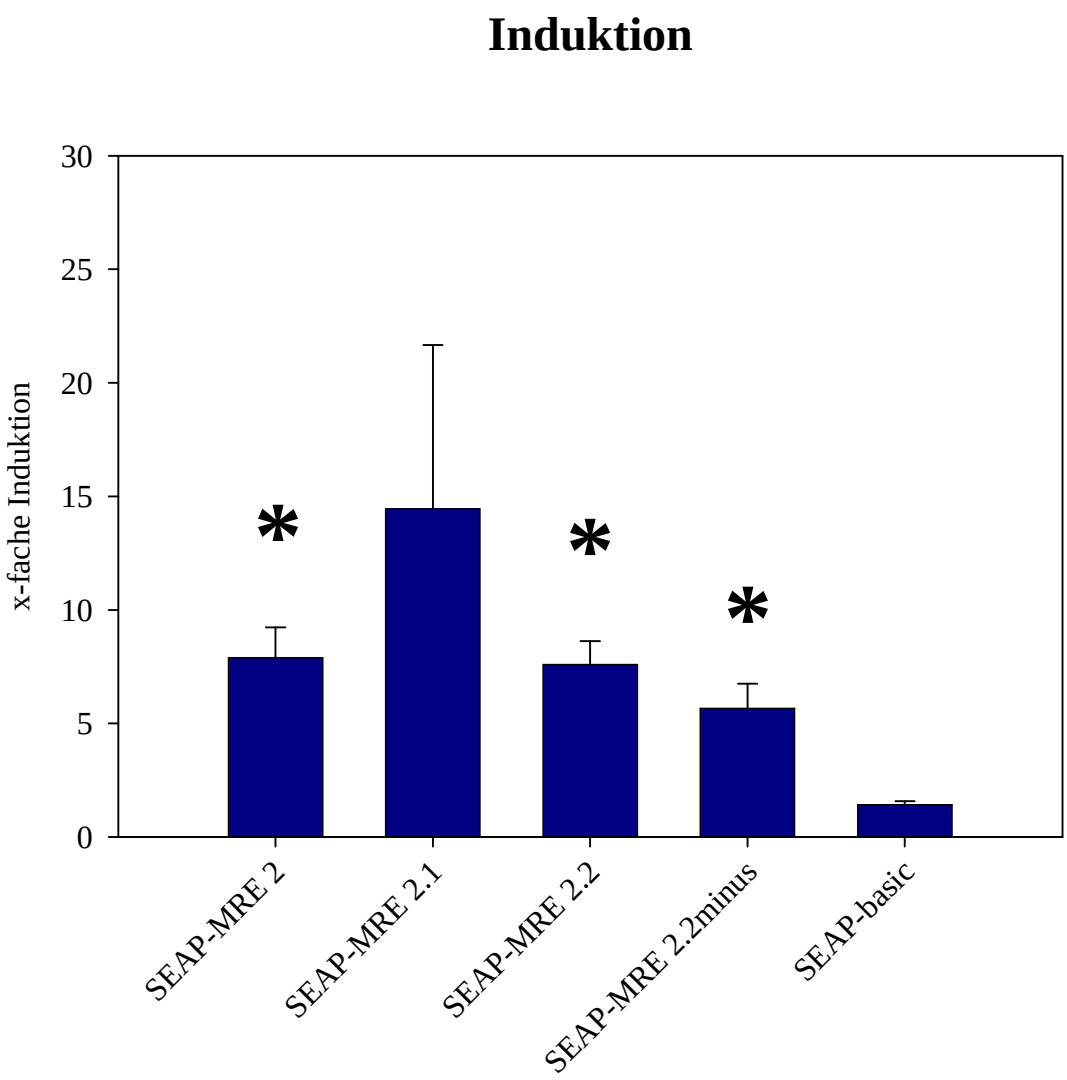

*Abb. 23 Übersicht über die x-fache Induktion des MRE 2 (n ≥ 26, ***** p ≤ 0,05 gegen SEAP-basic)*

Aus den Werten von Aldosteron- und Basalaktivität wird der Quotient gebildet. Die entstehende x-fache Induktion ist in Abbildung 23 dargestellt. Sowohl der MRE 2 als auch der Abschnitt MRE 2.2 und MRE 2.2minus zeigen mit 7,8; 7,6 und 5,7 vergleichsweise hohe Werte. Die 14-fache Induktion des MRE 2.1 ist am höchsten. Allerdings ist die Aussagekraft dieses Wertes durch den hohen Standardfehler eingeschränkt. Auch die Werte vom SEAP-Basic zeigen eine gewisse Grundaktivierung.

Ergebnisse

3.3 Die Region 15 bp

Die Region 15 bp umfasst jene Nukleotide, die sowohl im Abschnitt MRE 2.1, als auch im Abschnitt MRE 2.2 enthalten sind (siehe Abb. 19).

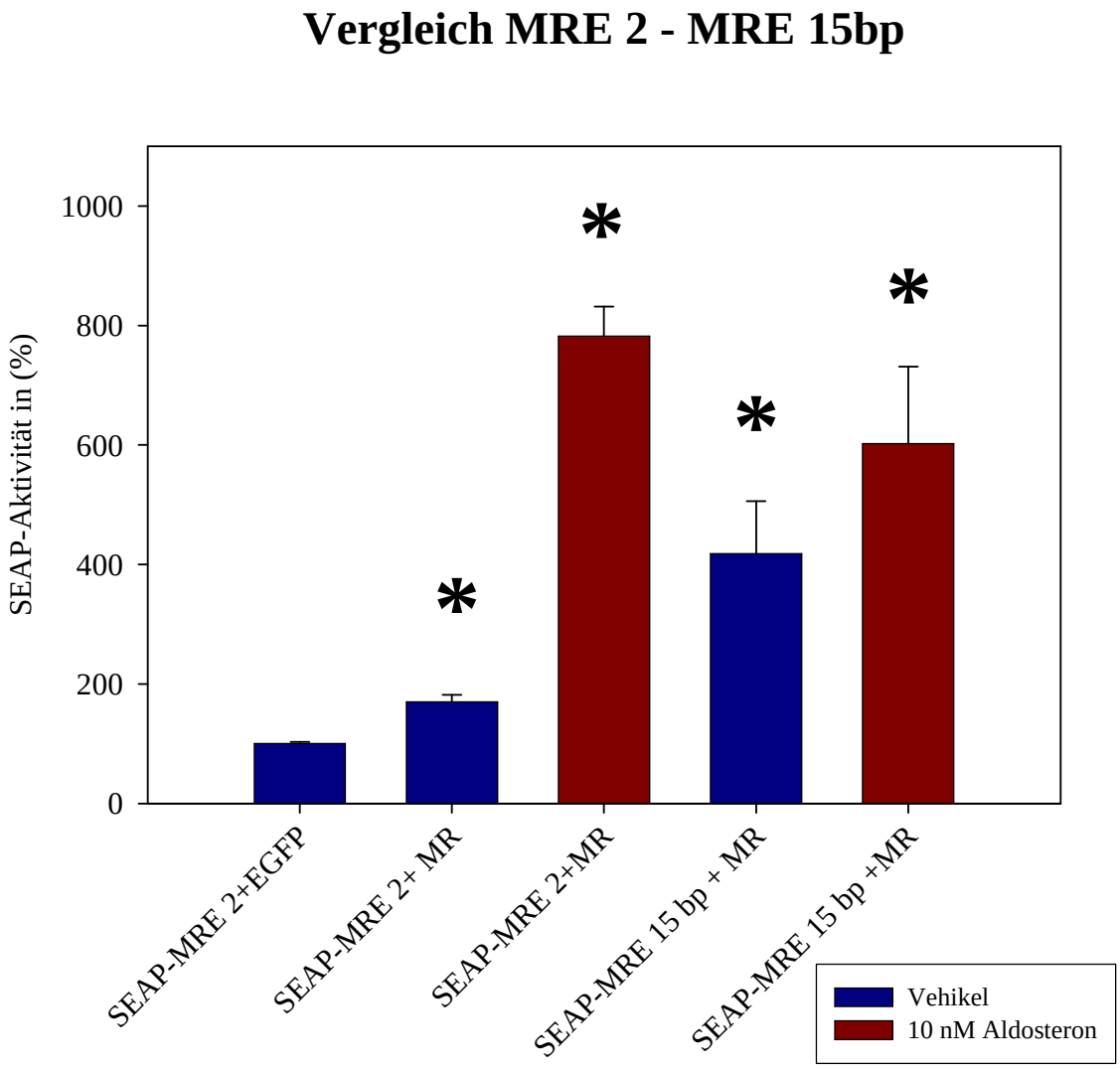

Abb. 24 Vergleich der Stimulierbarkeit des Abschnitts MRE 15 bp gegen MRE 2 (n ≥ 23), ***** *bei p < 0,05 gegen SEAP-MRE 2 + EGFP*

Das Diagramm in der Abbildung 24 stellt den Vergleich zwischen MRE 2 und dem Abschnitt MRE 15 bp dar. Es gelten dieselben experimentellen Bedingungen und Auswertungskriterien wie beim Abschnitt MRE 2 beschrieben. Als Fehlerindikator kommt ebenfalls der Standardfehler zum Einsatz.

Aus dem Diagramm wird die hohe basale Aktivität des Abschnitts MRE 15 bp deutlich, ca. 300 % mehr als der MRE 2 + EGFP + Vehikel. Mit 10 nM Aldosteron lässt er sich auf 600 % anregen.

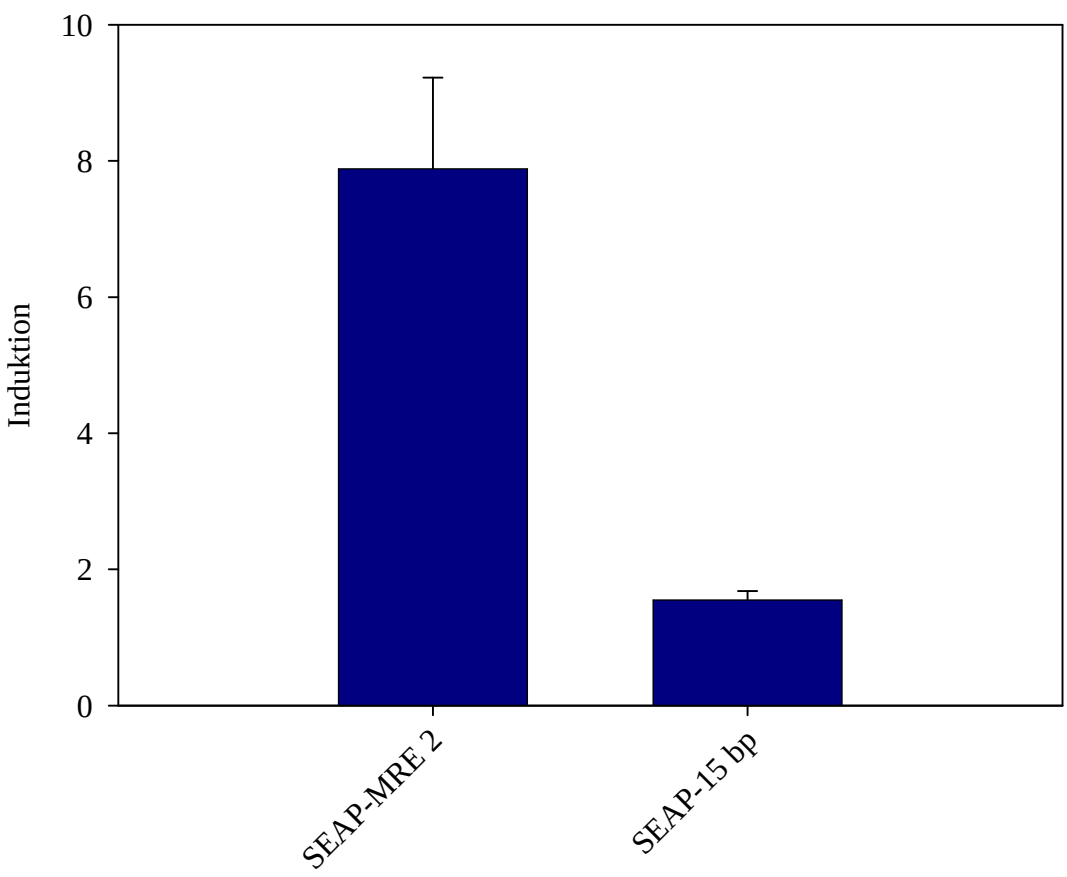

Abb. 25 Vergleich der x-fache Induktion der Abschnitte MRE 2 und MRE 15 bp (n ≥ 23)

Im obigen Diagramm (Abb. 25) wird die Induktion des MRE 15 bp mit dem bekannten MRE 2 verglichen. Die 1,5-fache Induktion ist sehr niedrig, selbst die Induktion des Abschnitts MRE 2.2minus (siehe Abb. 23) war höher.

3.4 Die Region MRE 2.1minus

Das Promotorkonstrukt MRE 2.1minus umfasst die DNS-Sequenz des Abschnitts MRE 2.1, ohne den Abschnitt MRE 15 bp. Er besteht also aus 69 Basenpaaren (siehe Abb. 19).

Das zu untersuchende Oligonukleotid wurde hybridisiert und in das Plasmid pCR2.1 zwischenkloniert.

Zur Generierung des Vektors wird aus dem Plasmid pCR2.1 (siehe Abb. 9) mittels der Restriktionsendonukleasen BamHI und EcoRI das Oligonukleotid herausgeschnitten. Das entstehende Produkt wird über ein PAGE-Gel aufgetrennt. Nachdem Färben mit

Ergebnisse

Ethidiumbromid ergibt sich unter UV-Licht folgendes Bild:

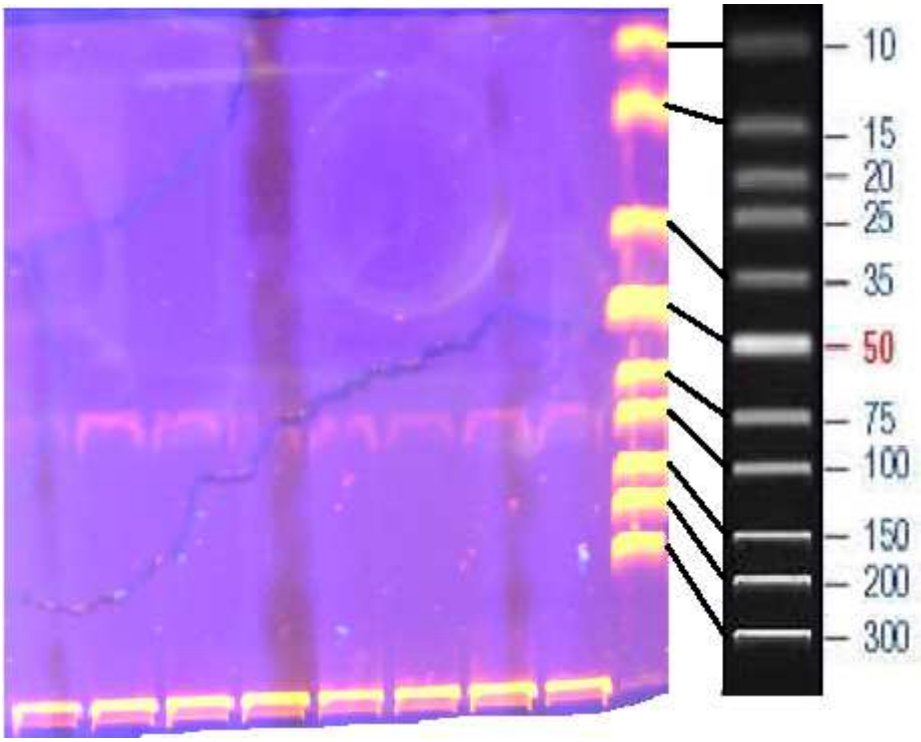

Abb. 26 Darstellung des PAGE-Gels mit der DNS des MRE 2.1minus, geschnitten mit BamHI und EcoRI, unter UV-Licht

In der Abbildung 26 ganz rechts, ist die DNS-Leiter 25-3010 von PEQLAB eingefügt. (vgl. http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticleDetails&which=25-3010, 03.11.2009)

Links daneben stellen die Banden das Ergebnis der Restriktion dar. Die Banden, die 15 und 10 bp umfassen, werden im Gel nicht mehr dargestellt. Laut Abbildung 15 ergibt sich entsprechend der Sequenz bei den verwendeten Restriktionsendonukleasen ein ungefähr 70 bp großes Fragment.

Ergebnisse

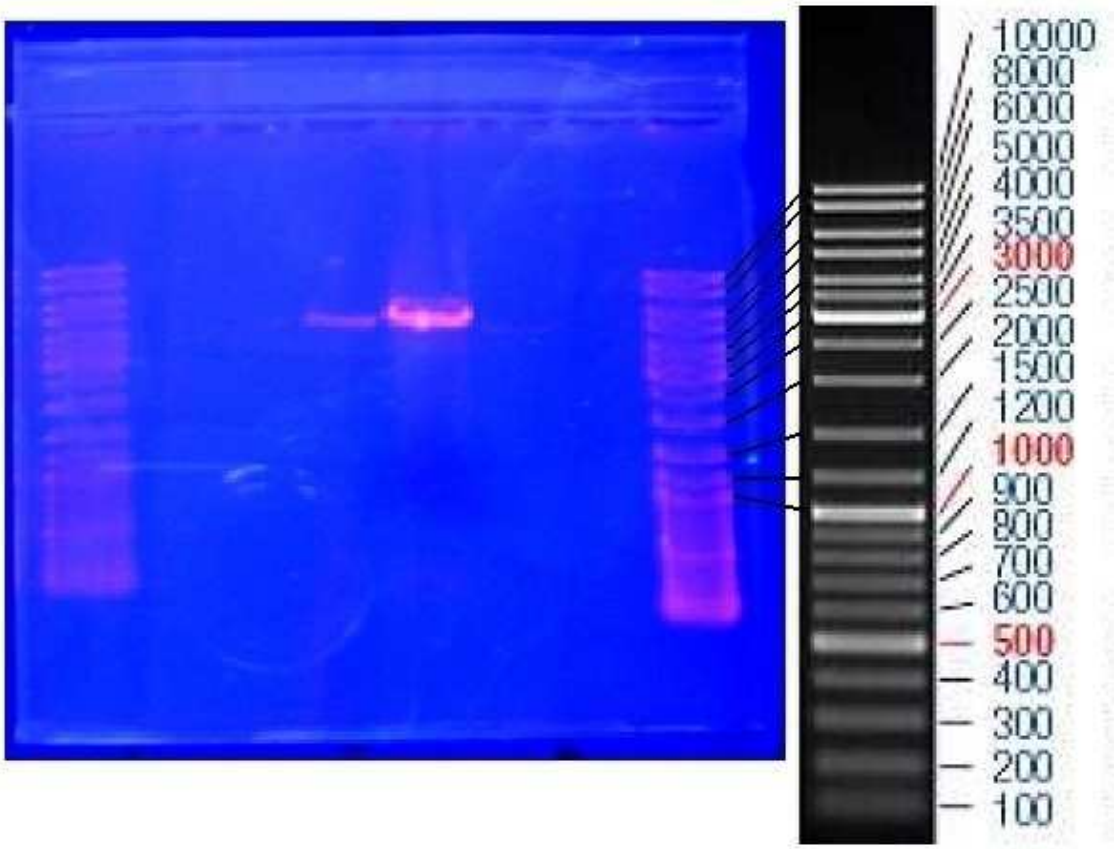

Abb. 27 Darstellung des Agarose-Gels des Plasmids pSEAP-Basic, aufgetrennt mit BglII und EcoRI, unter UV-Licht

Auch der Vektor pSEAP-Basic wird mittels der Restriktionsendonukleasen, hier BglII und EcoRI geschnitten. Es entsteht ein ca. 4600 bp enthaltendes DNS-Bruchstück, dessen Bande bildet sich in Abb. 27 zwischen der Bande mit 4000 und 5000 bp der DNS-Leiter ab. (Peqlab, vgl. http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticleDetails&which=25-2040, 03.11.2009)

Anschließend wird durch Ligation die entsprechende DNS-Sequenz von MRE 2.1minus aus dem Vektor pCR2.1 in die MCS des Vektors pSEAP-Basic eingefügt.

Die korrekte Basenreihenfolge wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Ergebnisse

Die Verwendung des klonierten Plasmids ergab folgende Ergebnisse:

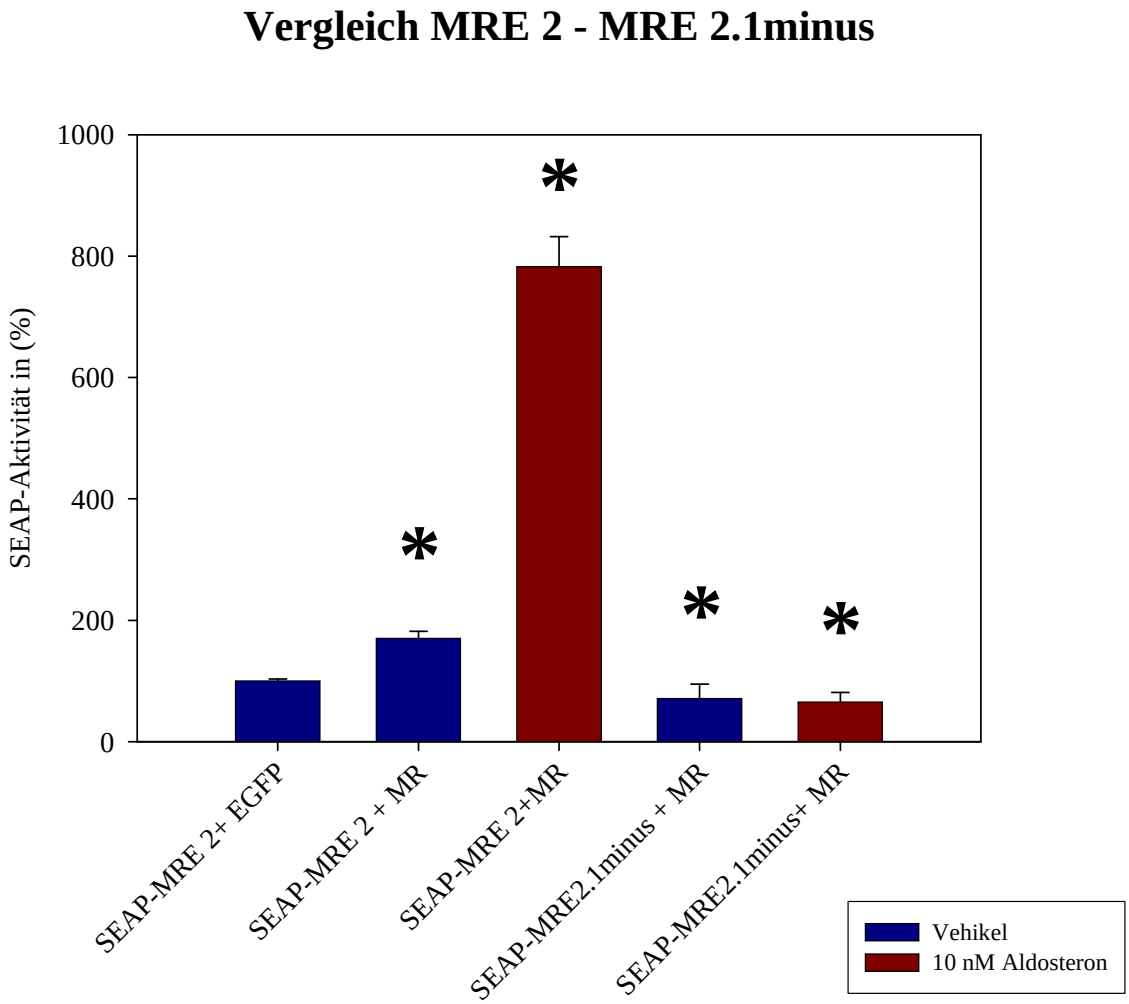

*Abb. 28 Vergleich der Stimulierbarkeit der Abschnitte MRE 2 und MRE 2.1minus($n \geq 14$), ***** bei $p < 0,05$ gegen SEAP-MRE 2 + EGFP*

Das in Abbildung 28 dargestellte Diagramm vergleicht die Stimulierbarkeit der Abschnitte MRE 2 und MRE 2.1minus. Für die Experimentalbedingungen und Auswertungskriterien gelten dieselben Bedingungen wie bei den Diagrammen zu MRE 2 beschrieben. Als Fehlerindikator dient der Standardfehler. Auffällig ist sowohl die geringe Basalaktivität des Promotorfragments (140 %), als auch die geringe Stimulierbarkeit unter 10 nM Aldosteron.

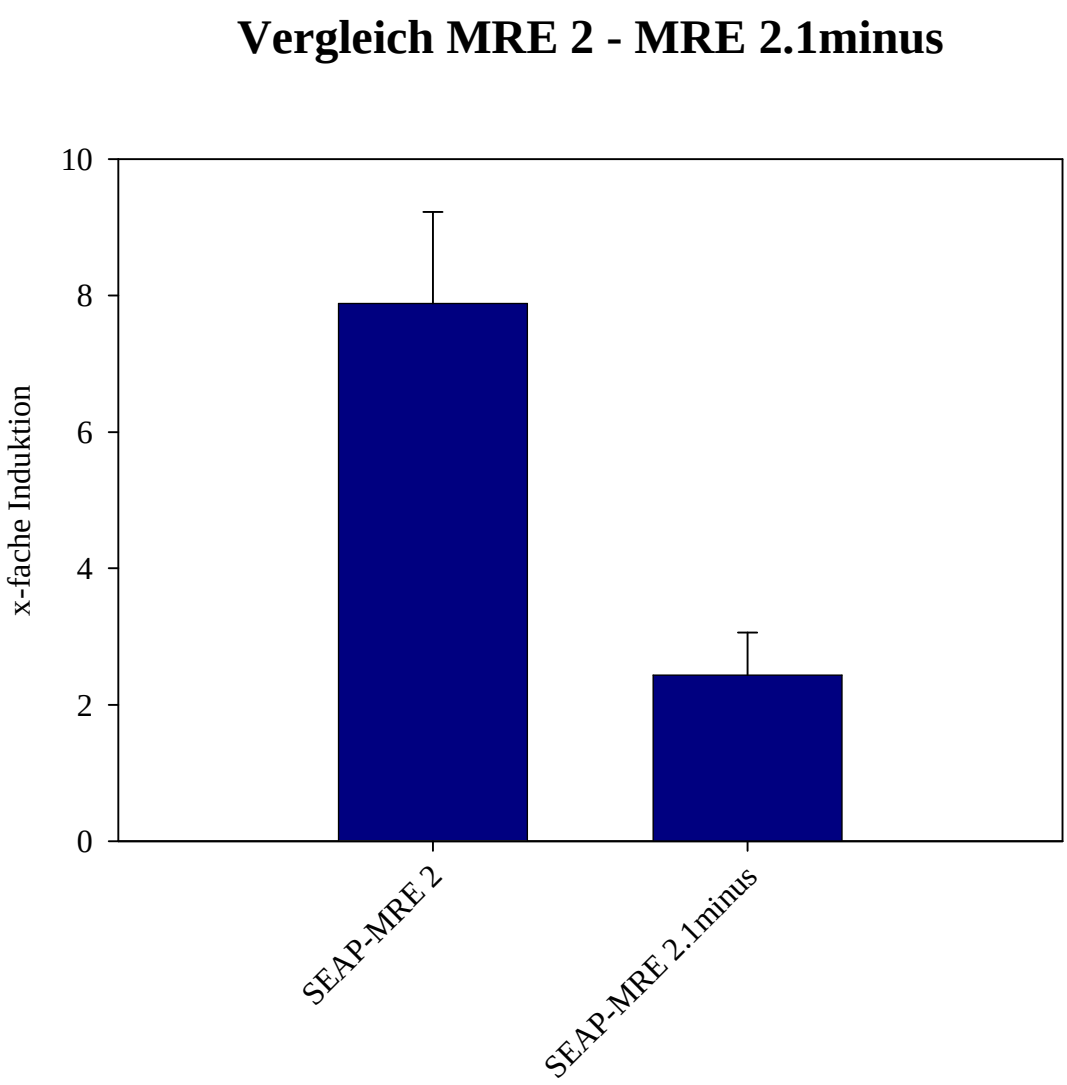

Abb. 29 Vergleich der x-fache Induktion der Abschnitte MRE 2 und MRE 2.1-(n ≥ 12)

Im Diagramm (Abb. 29) ist die Induktion der Abschnitte MRE 2 und MRE 2.1minus abgebildet. Die zweifache Induktion liegt im sehr niedrigen Bereich.

3.5 Übersicht über den Proteingehalt der Zellen

Aus den Werten des Bicinchoninsäureassays werden die Diagramme der Abbildung 30 und 31 gebildet. Als Fehlerindikator dient der Standardfehler. Die Kontrolle der Proteinwerte dient zum Überprüfen eventueller unspezifischer Schädigungen der Zellen. Da keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt der Zellen vorliegen, kann dies ausgeschlossen werden.

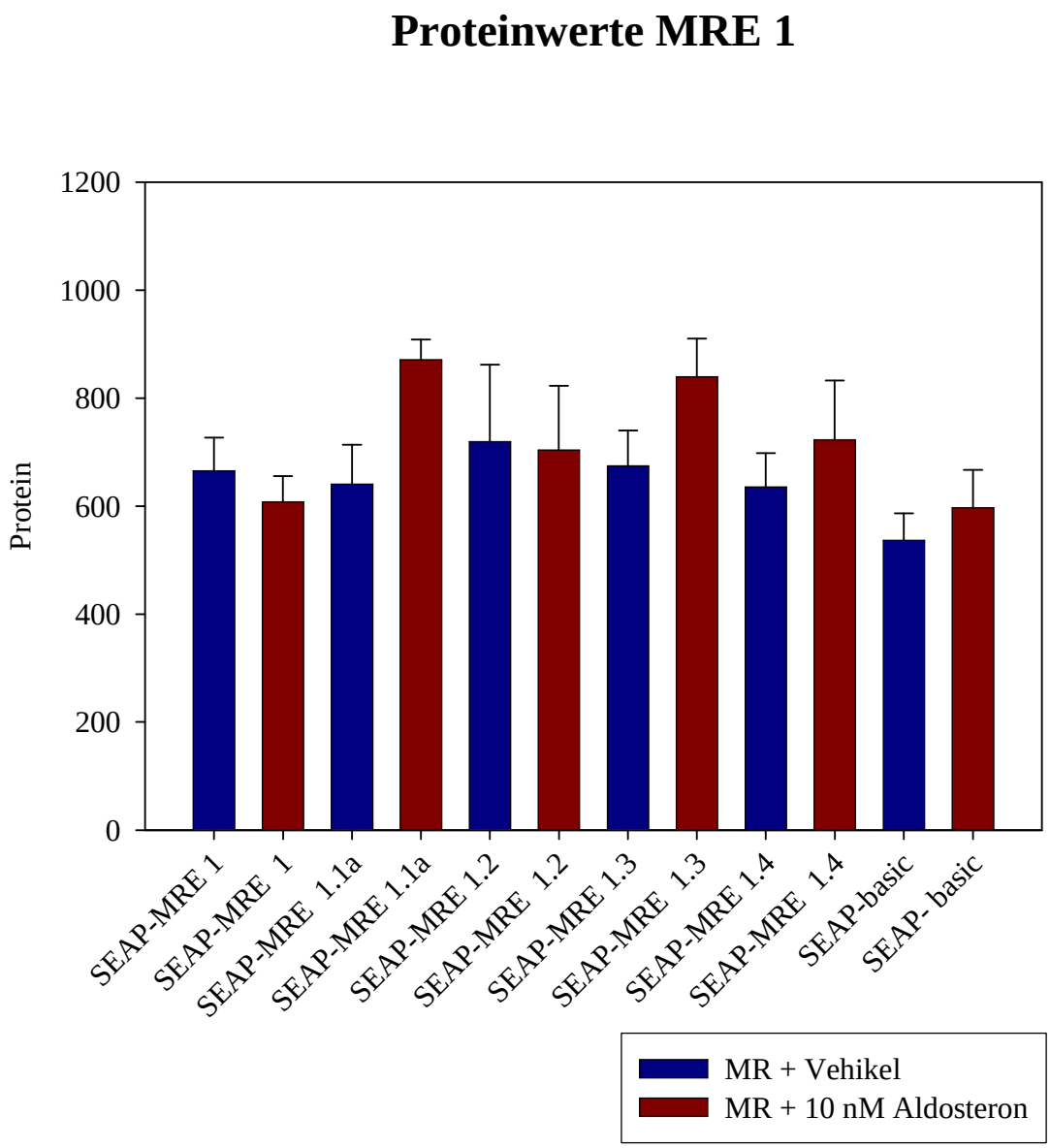

Abb. 30 Übersicht über den Proteingehalt der Abschnitte des MRE 1, (n 3 bis 14)

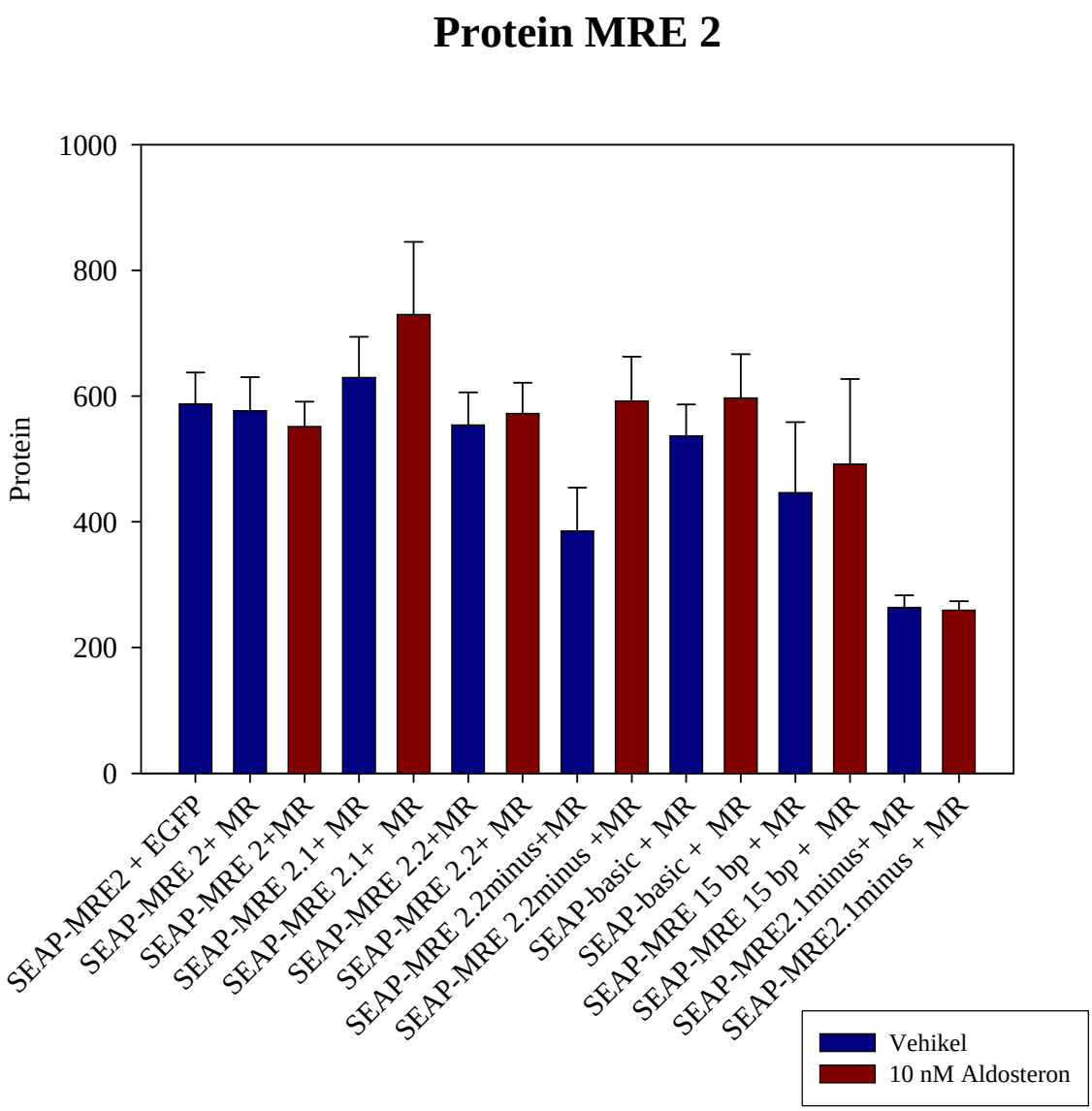

Abb. 31 Übersicht über den Proteingehalt der Abschnitte des MRE 2, (n 3 bis 36)

3.6 Vergleich mit Dexamethason

Im folgenden Experiment wird die Stimulierbarkeit des MRE 2 unter Aldosteron und Dexamethason verglichen. Dazu werden die Zellen analog zu den obigen Versuchen transfiziert. Nach 24 Stunden erhalten sie dann entweder die Vehikellösung mit DMSO, 10 nM Aldosteron, 100 nM Dexamethason oder 10 nM Aldosteron und 100 nM Dexamethason.

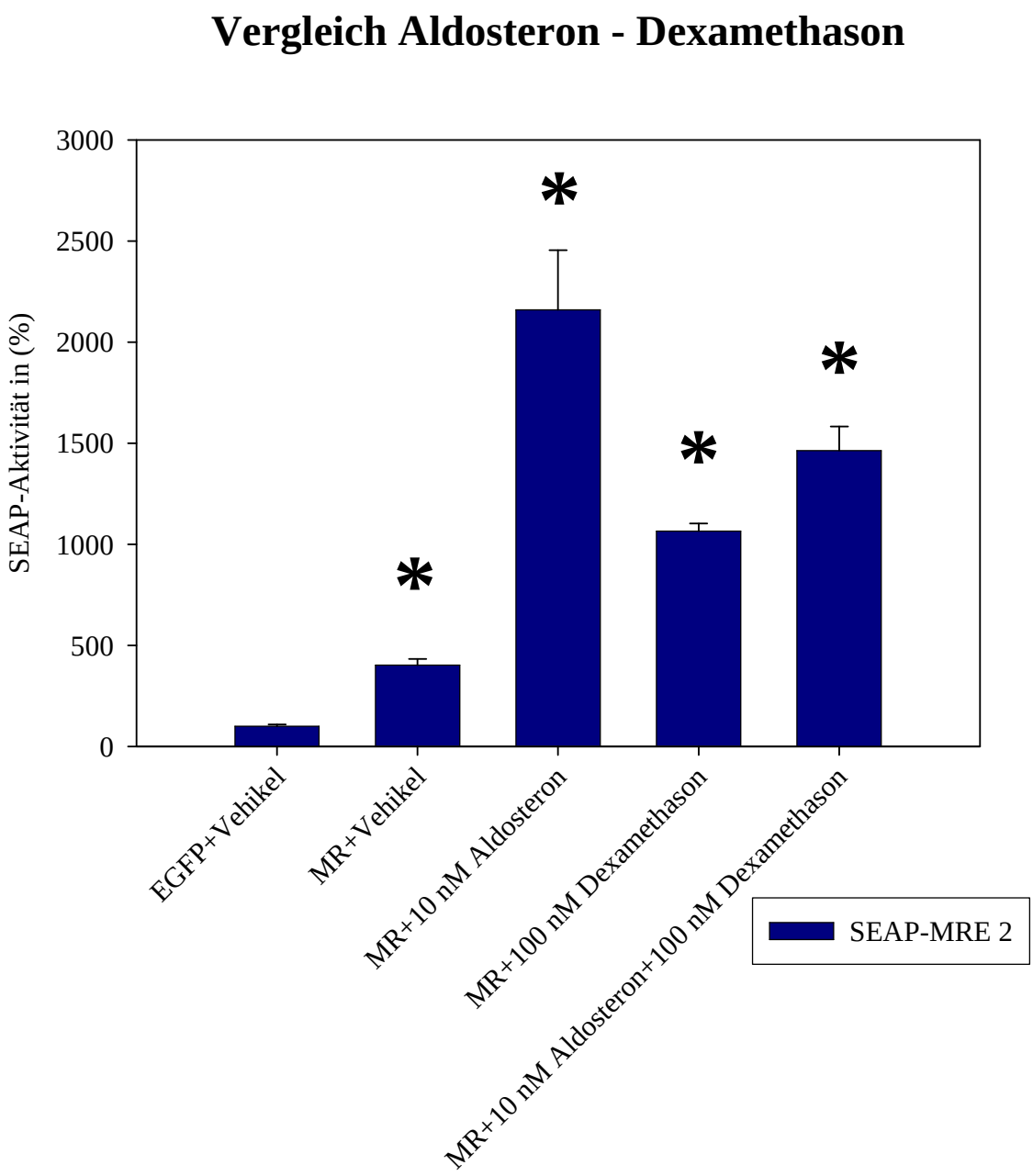

Abb. 32 Vergleich der Stimulierbarkeit des MRE 2 unter Aldosteron und Dexamethason ($n \geq 4$), ******* *bei $p < 0,05$ gegen EGFP + Vehikel*

Im Diagramm der Abbildung 32 sind die unterschiedlichen Stimulierbarkeiten des MRE 2 unter Aldosteron und Dexamethason ersichtlich. Der MRE 2 mit EGFP und Vehikel wird auf 100 % festgesetzt. Als Fehlerindikator dient der Standardfehler. Die sonstigen Auswertungskriterien sind denen der anderen Diagramme analog.

Aus dem Diagramm wird deutlich, dass sich der MRE 2 mit Aldosteron allein am besten stimulieren lässt. Die Anregbarkeit von Aldosteron und Dexamethason ist um ca. 500 %

niedriger. Die Stimulierbarkeit des MRE 2 unter Dexamethason allein ist etwa doppelt so hoch wie die basale Aktivität des MRE 2 mit MR.

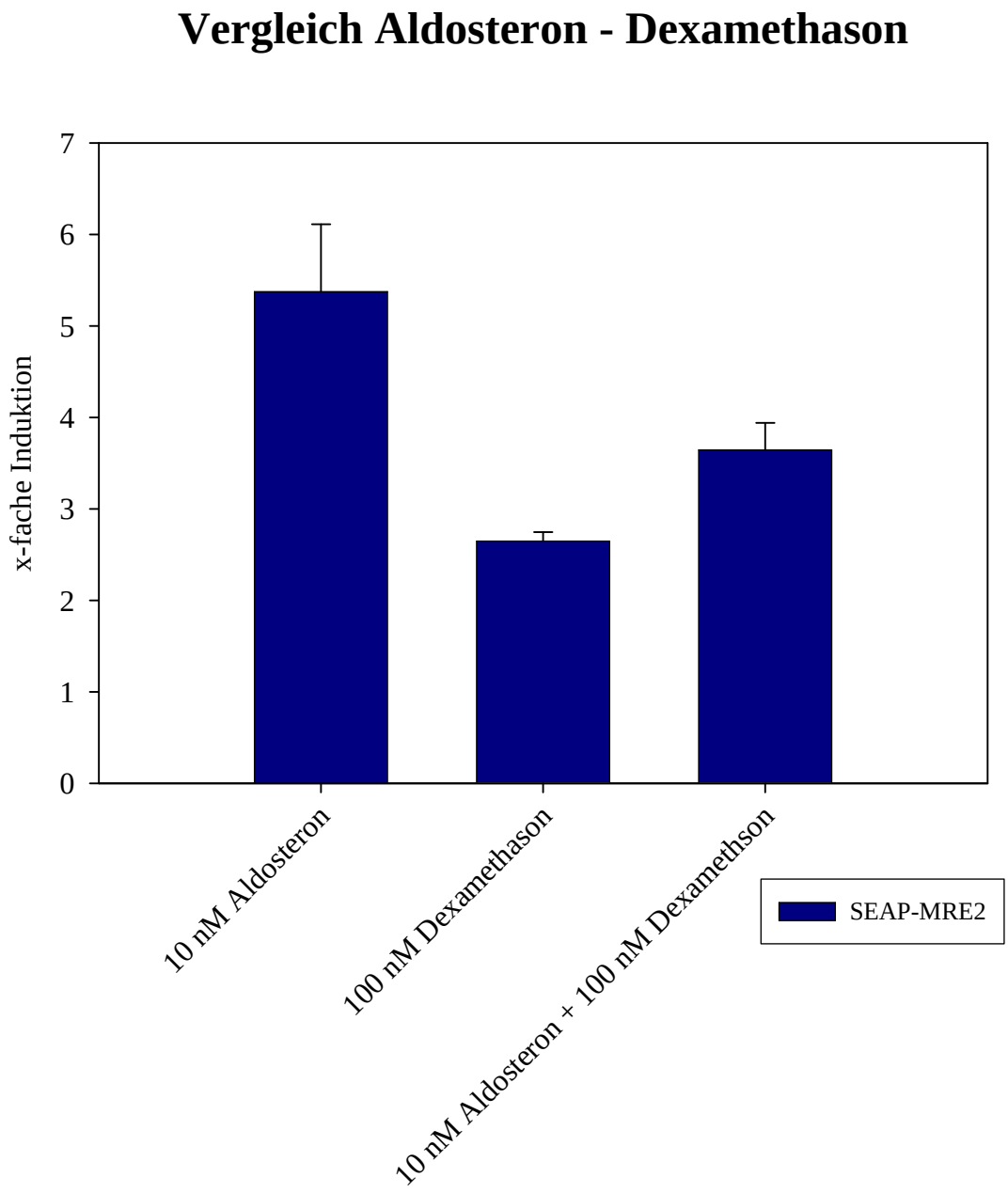

Abb. 33 Vergleich der x-fachen Induktion des MRE 2 unter Aldosteron, Dexamethason und Aldosteron + Dexamethason (n = 4)

Im Diagramm der Abbildung 33 ist die x-fache Induktion des MRE 2 unter Aldosteron, Dexamethason und Aldosteron + Dexamethason dargestellt. Sie beträgt für Aldosteron allein mehr als zwei. Bei Aldosteron mit Dexamethason und bei Dexamethason allein ist sie ungefähr um den Faktor 1,0 bzw. 1,5 niedriger.

Ergebnisse

3.7 MRE 1.3 Konzentrationsreihe

Basierend auf den Ergebnissen der Diagramme in Abbildung 15 bis 17 wurde die Stimulierbarkeit des MRE 1.3 unter verschiedenen Konzentrationen mit Aldosteron untersucht. Die sonstigen Versuchsbedingungen und Auswertungskriterien entsprechen denen bei Abbildung 15 bis 17 genannten. Aus Vergleichbarkeitsgründen ist der MRE 1.3 mit Vehikel auf 100 % festgelegt. Als Fehlerindikator dient der Standardfehler.

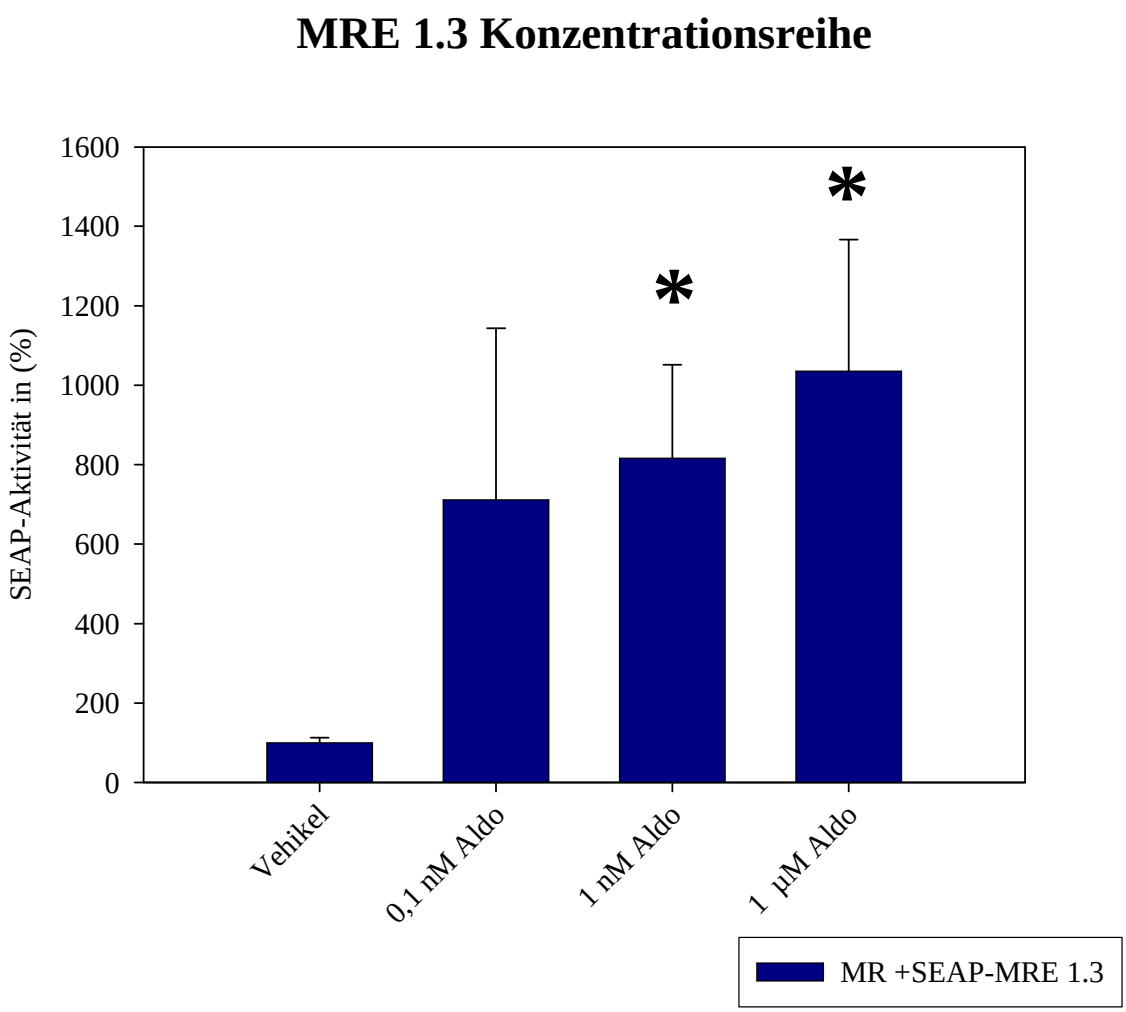

Abb. 33 Stimulierbarkeit des MRE 1.3 unter verschiedenen Aldosteronkonzentrationen (n = 6), ******* *bei p < 0,05 gegen MRE 1.3 + Vehikel*

Aus dem Diagramm der Abbildung 33 wird ersichtlich, dass die Stimulierbarkeit des Abschnitts MRE 1.3 unter steigender Aldosteronkonzentration zunimmt. Sie beträgt bei 0,1 nM Aldosteron ca. 700% der Basalaktivität des MRE 1.3. Bei 1 µM Aldosteron liegt sie bereits bei über 1000 %.

Ergebnisse

3.8 MRE 2.2minus Konzentrationsreihe

Basierend auf den Ergebnissen der Diagramme 20 bis 22 wird auch der Abschnitt MRE 2.2minus auf seine Stimulierbarkeit unter verschiedenen Aldosteronkonzentrationen untersucht. Die Konditionen entsprechen dem der Abbildung 33. In diesem Falle wird der Abschnitt MRE 2.2minus unter Vehikellösung auf 100 % festgelegt.

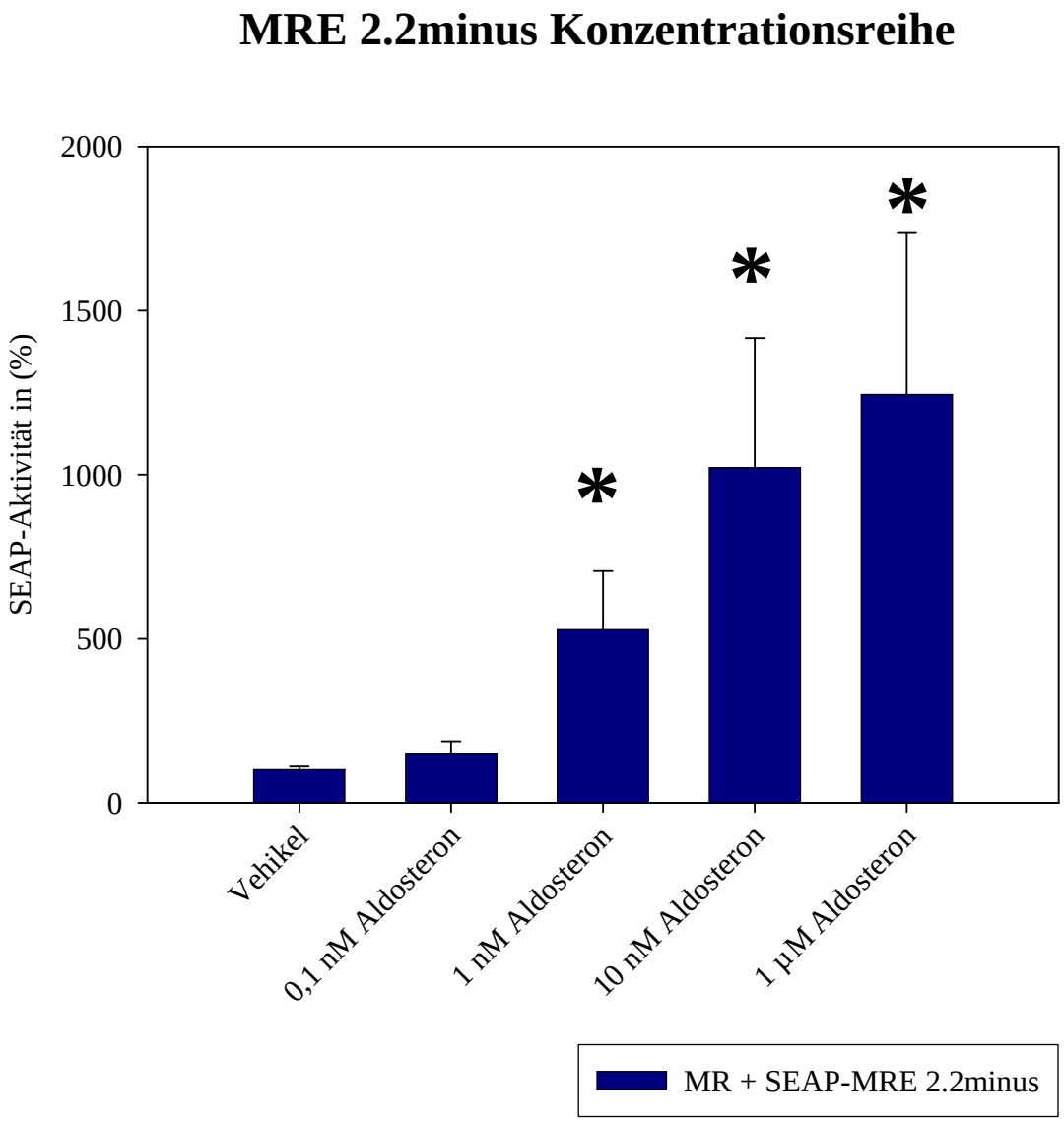

Abb. 34 Stimulierbarkeit des MRE 2.2minus unter verschiedenen Aldosteronkonzentrationen (n = 6), ***** *bei p < 0,05 gegen Vehikel*

Auch beim Promotorkonstrukt MRE 2.2minus wird deutlich, dass die Stimulierbarkeit des Abschnitts bei steigender Aldosteronkonzentration in Abbildung 34 ebenfalls ansteigt. So

beträgt sie bei einer Konzentration von 0,1 nM Aldosteron ca. 200 % der Basalaktivität des Abschnitts. Bei 1 μM Aldosteron beträgt sie 1200 %.

3.9 Übersicht MRE 1-MRE 1.3

Ebenfalls unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die in Abbildung 16 bis 18 dargestellt wurden, wurde das Promotorkonstrukt MRE 1.3 unter verschiedenen Parametern untersucht. So wurde die Stimulierbarkeit des hMR mit Aldosteron mit der Stimulierbarkeit mit dem GR und Dexamethason auf die Abschnitte MRE 1 und MRE 1.3 untersucht. Es gelten dieselben Reaktionsbedingungen und Auswertungskriterien wie bei Abbildung 16 bis 18 beschrieben.
Aus Vergleichbarkeitsgründen wird die Basalaktivität des MRE 1 mit MR und Vehikellösung auf 100 % festgesetzt. Als Fehlerindikator dient der Standardfehler.

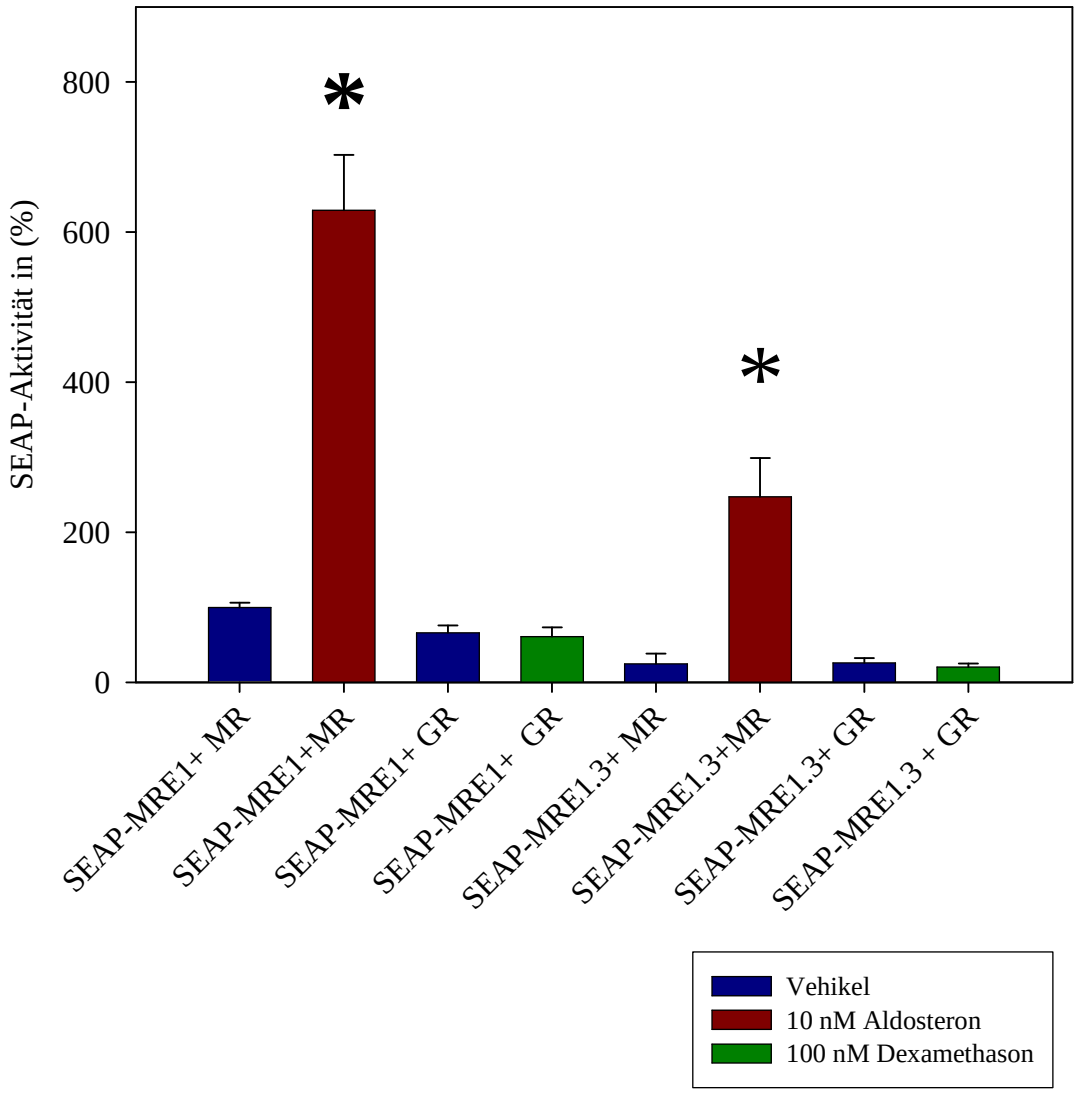

*Abb. 36 Übersicht über die Stimulierbarkeit der Abschnitte MRE 1 und MRE 1.3 mit dem MR und Aldosteron sowie dem GR und Dexamethason (n ≥ 8), * bei p < 0,05 gegen MRE 1.3 + MR,* ***** *bei p < 0,05 gegen MRE1 + MR*

Aus dem Diagramm in Abbildung 36 wird die hohe Stimulierbarkeit des MRE 1 und MRE 1.3 mit MR und Aldosteron offensichtlich. Sie ist hier beim MRE 1 höher als beim MRE 1.3. Die basale Aktivität der beiden genannten Abschnitte mit dem Glukokortikoidrezeptor ist niedriger als die Basalaktivität des MRE 1. Auch unter der Gabe von 100 nM Dexamethason ließen sich diese Abschnitte statistisch nicht signifikant stimulieren.

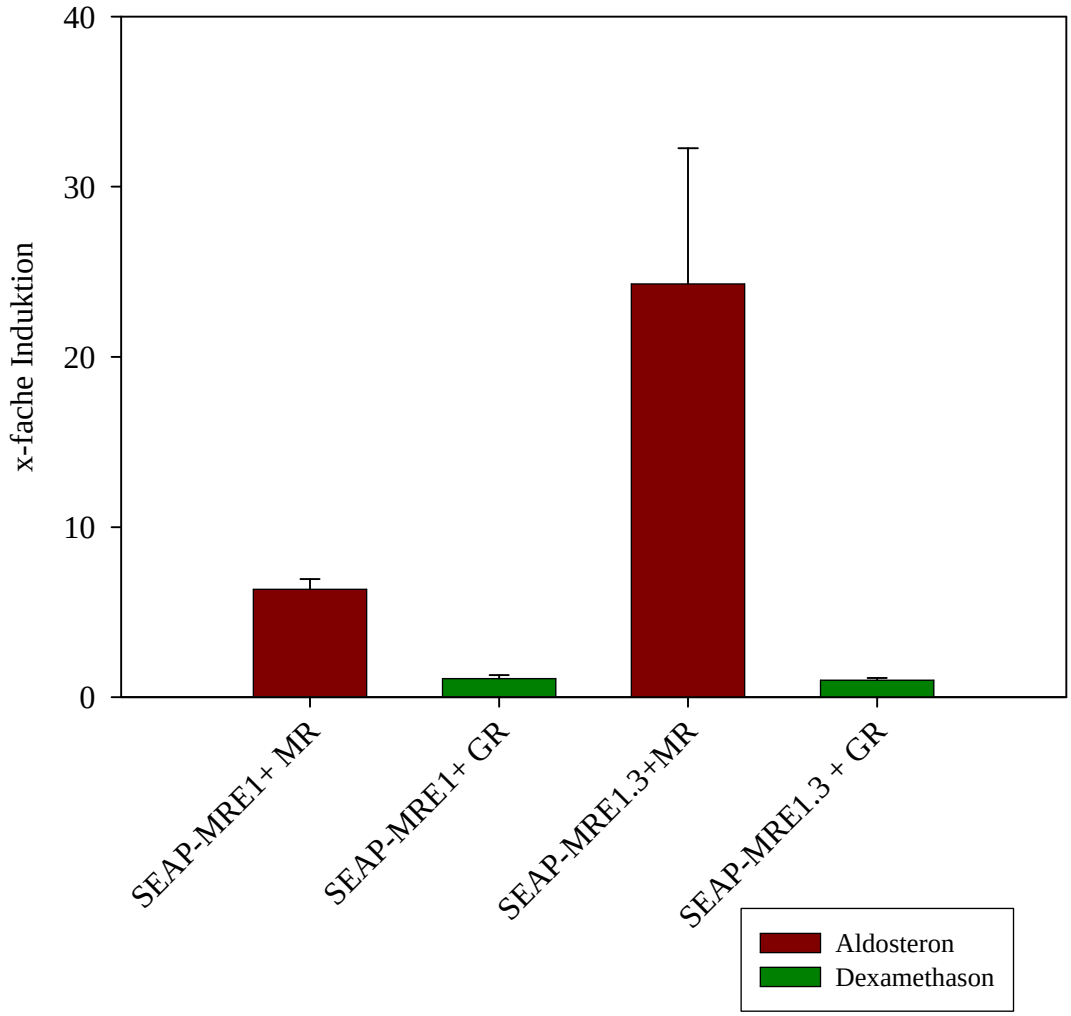

Abb. 37 Übersicht über die x-fache Induktion der Abschnitte MRE 1 und MRE 1.3 mit dem MR und Aldosteron sowie dem GR und Dexamethason (n ≥ 8)

Aus den Werten mit Aldosteron bzw. Dexamethason und dem dazugehörigen Vehikelwert wurde der Quotient gebildet. Die so gebildete x-fache Induktion ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Induktion des MRE 1.3 ist am höchsten, die des MRE 1 bei ca. 5. Die Induktion der beiden Abschnitte, die den GR und Dexamethason erhalten hatten, beträgt nur ca. 1.

3.10 Übersicht MRE 2 – MRE 2.2minus

Analog zum Ansatz und den Konditionen der Abbildung 36 wurden die Promotorkonstrukte MRE 2 und MRE 2.2minus unter verschiedenen Parametern untersucht. Die Stimulierbarkeit

des MRE 2 mit MR und Aldosteron wurde die des Abschnitts MRE 2.2minus mit GR und Dexamethason gegenübergestellt. Aus Vergleichbarkeitsgründen wird der MRE 2 mit EGFP Vehikel auf 100 % festgesetzt. Alle anderen Werte der Abbildungen 38 und 39 beziehen sich darauf. Als Fehlermaß dient auch hier der Standardfehler.

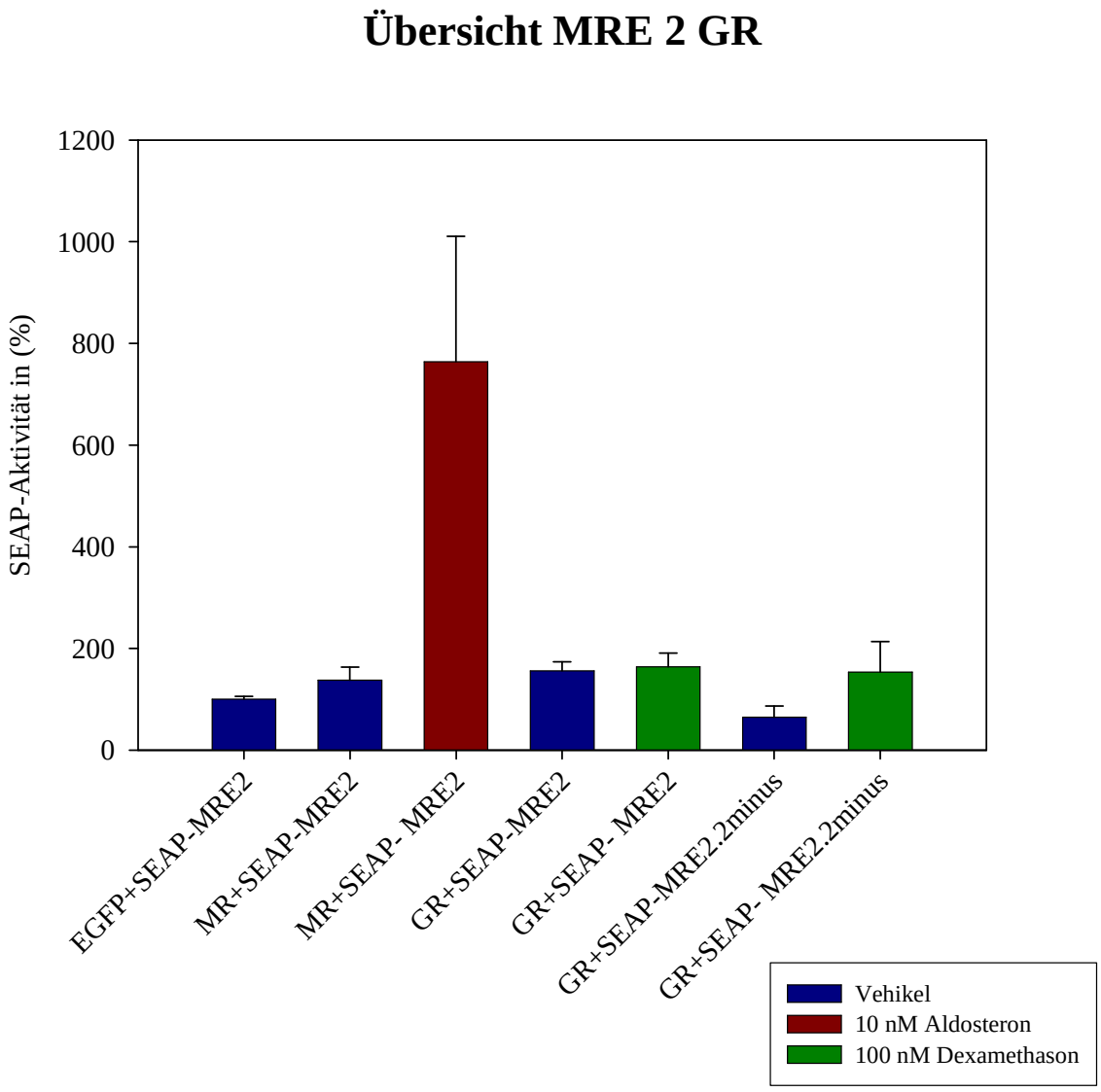

Abb. 38 Übersicht über die Stimulierbarkeit der Abschnitte MRE 2 und MRE2.2minus mit dem MR und Aldosteron sowie dem GR und Dexamethason (n ≥ 2), ***** *bei p < 0,05 gegen EGFP + SEAP-MRE2*

Auch in diesem Diagramm (Abb. 38) fällt die hohe Stimulierbarkeit des MRE 2 mit Aldosteron ins Auge. Die Induktion der Promotorkonstrukte MRE 2 und MRE 2.2minus ist niedrig, egal ob

sie Dexamethason oder die Vehikellösung erhalten haben.

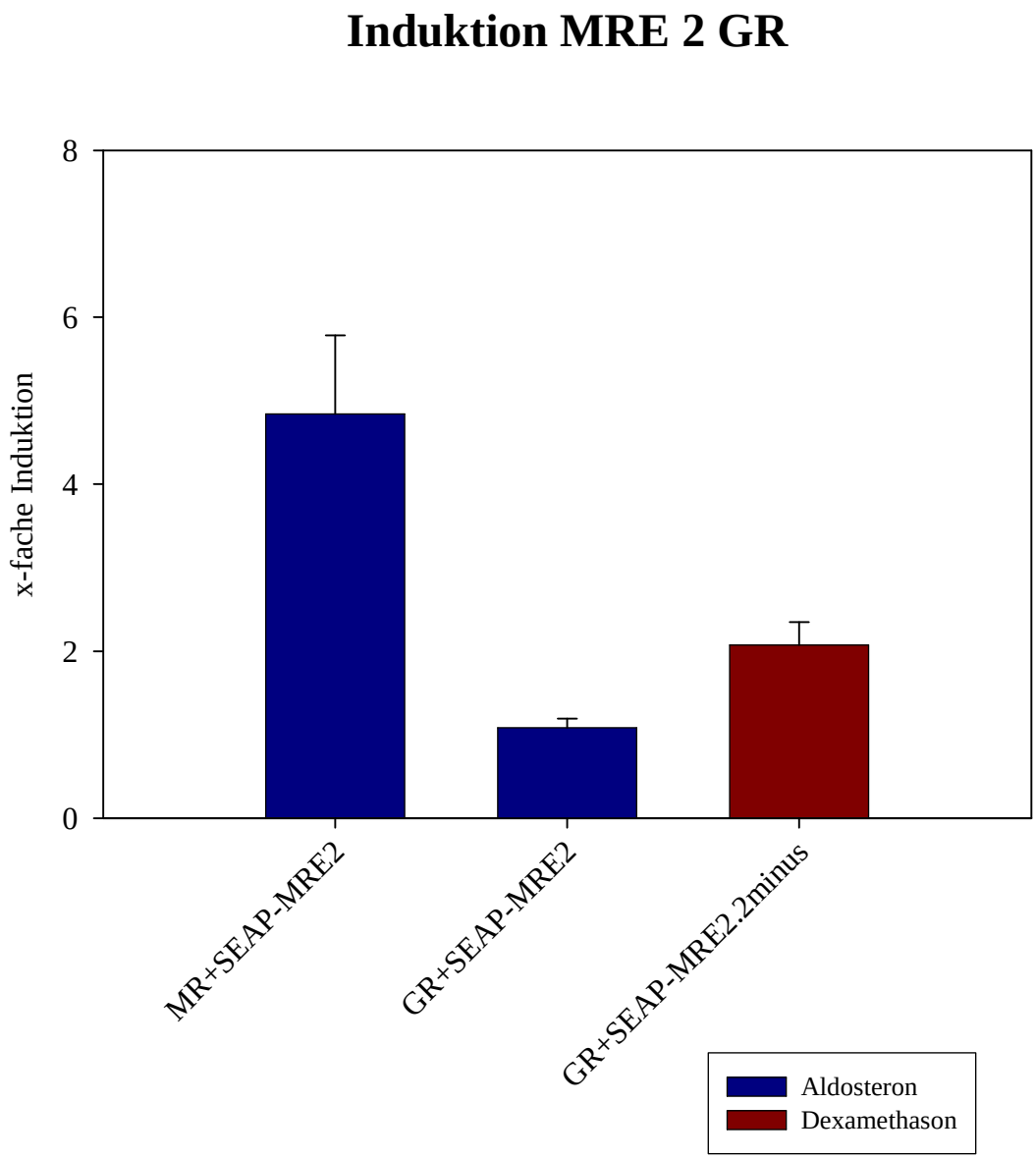

Abb. 39 Übersicht über die x-fache Induktion der Abschnitte MRE 2 und MRE2.2minus mit dem MR und Aldosteron sowie dem GR und Dexamethason (n ≥ 2)

Aus der Abbildung 39 ist die Induktion von MRE 2 mit Aldosteron sowie MRE 2 und MRE 2.2minus mit dem GR und Dexamethason zu entnehmen. Die Induktion mit Aldosteron ist am höchsten, die mit Dexamethason nur gering.

4. Diskussion

Durch die RALES- und EPHESUS- sowie die 4E-Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Wirkung von Aldosteron bzw. dessen Mineralokortikoidrezeptor auf mehr als nur die Elektrolyt- und Wasserhomöostase erstreckte [29,43,44]. Zur Erklärung von Inflammation, Fibrose und vaskulärer Dysfunktion wurde eine ganze Reihe von pathophysiologischen Faktoren diskutiert [29,46,42]. Die Beteiligung von EGFR zur Erläuterung dieser Prozesse ist dafür eine attraktive Hypothese. Die Interaktion des EGFR bzw. dessen Second-Messenger-Wegen mit Aldosteron oder Peptidhormonen wie Angiotensin II konnte belegt werden [42,73,74]. Dann erfolgte der Nachweis, dass Aldosteron die EGFR-Expression stimuliert [75,76]. Dieser Effekt konnte mit Spironolacton antagonisiert werden und ließ sich nicht durch Dexamethason herbeiführen. Dabei wurde der Nachweis erbracht, dass der MR mit dem Promotor des EGFR interagiert. Ein klassisches GRE wurde nicht in der DNS-Sequenz des EGFR-Promotors gefunden. Stattdessen wurde die Region der Interaktion auf ein 316 bp großes DNS-Fragment eingegrenzt [69].

4.1 MR-induzierte EGFR-Promotoraktivität

Die ersten vom Startcodon in 5'-Richtung gelegenen 163 Basenpaare wurden als MRE 2 bezeichnet und die sich in 5'-Richtung daran anschließenden 153 Basenpaare als MRE 1. Diese DNS-Sequenzen wurden darauf mittels Restriktionsendonukleasen in weitere Abschnitte untergliedert, wie aus den Abbildungen 14 und 15 ersichtlich.

Im Abschnitt MRE 1 zeigt das Promotorkonstrukt MRE 1.3 statistisch signifikant die höchste Induktion. Die der anderen Promotorkonstrukte sind niedrig. Da der MRE 1.3 auch die Basenpaare des MRE 1.4 umfasst (siehe Abb. 14) und der MRE 1.4 durch Aldosteron nicht induzierbar ist, ist das MRE in der DNS Sequenz zu vermuten, die nicht im MRE 1.4 enthalten ist (vgl. Abb. 15). Dies sind die 25 Basenpaare 276-251. Möglicherweise überlappt sich das MRE auch mit den angrenzenden Abschnitten des MRE 1.3 (also MRE 1.2 bzw. 1.4) und Teil deren DNS werden zur Aktivierung benötigt.

Im Abschnitt MRE 2 unterscheiden sich sowohl der MRE 2.2 als auch der MRE 2.2minus (sowie die Positivkontrolle MRE 2) signifikant gegenüber der Negativkontrolle SEAP-Basic. Aufgrund der Tatsache, dass der MRE 2.1 und der MRE 2.2 eine hohe Induktion zeigen, vermuteten wir das MRE in jenen 15 bp, mit denen sich der MRE 2.1 mit dem MRE 2.2 überlappt (siehe Abb. 20). Die Ergebnisse des Reporter Gene Assays der daraufhin neu klonierten Sequenz zeigt eine hohe Grundaktivität des Promotorkonstrukts, aber die Induktion liegt nur geringfügig über eins (siehe Abb. 25). Infolgedessen wurde ein Promotorkonstrukt

ohne jene 15 bp kloniert (vgl. Abb. 26 - 29), aber auch dieser DNS-Abschnitt zeigt im Reporter Gene Assay nur eine geringe Induzierbarkeit durch Aldosteron (vgl. Abb. 29). Diese zwei Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass das MRE in der DNS-Sequenz des Promotorkonstrukts MRE 2.2minus zu suchen ist.

Bei den Reporter Gene Assays wurde bewusst keine humane Zelllinie gewählt, sondern Nierenzellen des Opossums, um Verfälschungen durch endogen produzierten MR oder EGFR zu vermeiden. Zur Erlangung möglichst auf den Menschen übertragbarer Werte wurden die Reporter Gene Assays mit physiologischer Aldosteronkonzentration im Nanomolarbereich durchgeführt. Durch das Transfizieren von LacZ und den β-Galaktosidase-Assays konnten Reporter Gene Assays mit niedriger Transfektion verworfen werden. Die je Ansatz durchgeführte Positivkontrolle mit MRE 1 bzw. 2 und die einzelnen Negativkontrolle mit SEAP-Basic erlaubten das Erkennen und Ausschließen von Falsch-positiv oder –negativen Werten. Durch die Proteinwerte, die mittels BCA ermittelt wurden, konnten einzelne Experimente, bei denen übermäßige Zellschädigung stattgefunden hatte, ebenfalls ausgeschlossen werden (siehe Abb. 30 und 31).

Um die Wirkung von Aldosteron mit dem Glukokortikoid Dexamethason zu verdeutlichen, wurden Reporter Gene Assays mit den beiden genannten Pharmaka bzw. einer Kombination der beiden durchgeführt. Die hohe Induktion durch Aldosteron belegen die Stimulierbarkeit des EGFR-Promotors durch Mineralokortikoide, während die niedrige (allerdings statistisch nicht signifikante) Induktion von Dexamethason nur auf allgemein stimulierende Faktoren zurückzuführen ist (vgl. Abb. 32 und 33).

Die beiden Promotorkonstrukte MRE 2.2minus und MRE 1.3 wurden als DNS-Sequenz mit vermutlich enthaltendem MRE steigenden Konzentrationen von Aldosteron behandelt. Wie erwartet steigt die EGFR-Expression bei zunehmender Aldosteronkonzentration an (vgl. Abb. 33, 34). Zur Überprüfung der Aussage, dass weder das MRE 1 noch MRE 2 mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR) stimulierbar ist, wurde die Wirkung von Aldosteron mit MR mit der von Dexamethason und dem GR auf die genannten Promotorkonstrukte verglichen. Weder der MRE 1 noch der MRE 1.3 lassen sich mit Glukokortikoid/GR induzieren, während die Kombination Aldosteron/MR zu einer hohen Induktion der beiden genannten Promotorkonstrukte führt (vgl. Abb. 35, 36). Der analoge Ansatz in Abb. 37 und 38 widerlegt die Existenz eines klassischen GRE auch in MRE 2 bzw. MRE 2.2minus.

Diskussion

4.2 Untersuchung des MRE auf weitere Transkriptionsfaktor-bindungstellen mittels Transkriptionsfaktorbindungsanalyse

Der EGFR-Promotor wurde vor allem in den 1980er Jahren intensiv untersucht. Im Promotor sind weder TATA- noch CAAT-Boxen enthalten. Dafür greifen mehrere Sp1-Transkriptionsfaktoren an GC-reiche Sequenzen des Promotors an. Dies erhöht in vitro die Expression des EGFR. Auch wurde über Deletionskonstrukte, die für die Sequenz, welche für die Aktivierung zuständig ist, in den Basenpaaren 167 bis 105 vermutet [71,72]. Der Promotor des EGFR enthält außerdem Bindungsstellen für das AP-2 (*Activator Protein 2*). Dieser Transkriptionsfaktor kann durch Phorbolester die Transkription des Promotors steigern [77]. Der Faktor ETF steigert die Expression des EGFR. Er greift an GC-reiche Sequenzen an, allerdings nur in Promotoren ohne TATA-Box [78]. Außerdem verfügt der EGFR-Promotor über eine S1-Nuklease-sensitive Region, an die der Faktor ERDBP-1 (*EGF Response DNA Binding Protein*) spezifisch bindet und so die Expression steigert [79]. Weiterhin ist die Stimulation des EGFR durch Östrogen und p53 bekannt [80,81]. Dabei bindet der Wild-Typ p53 an eine 27 bp umfassende Sequenz: -„5‘-AGCTAGACGTCCGGGCAGCCCCCGGCG“, die sich im MRE 1.2 befindet (vgl. Abb. 15) Auch p53-Mutanten, die aus Tumoren isoliert wurden, können an den EGFR angreifen und diesen auch transaktivieren [81,82]. Außerdem stimuliert Calcitriol den EGFR über ein Vitamin-D-Responsives Element (VDRE). An dieses bindet ein Heterodimer aus Vitamin-D-Rezeptor und Retinoid-X-Rezeptor [83]. Von Retinsäure wird sowohl eine Stimulation als auch eine Inhibition des EGFR-Promotors berichtet [84,85,86]. Schilddrüsenhormone senken die Expression von EGFR [87]. Der T_3-Rezeptor kann SP1-abhängig durch überlappende Bindungsstellen den EGFR-Promotor hemmen [88].
Zwei Repressoren des EGFR-Promotors sind bekannt. Der ETR genannte Repressor (*EGFR Transcriptional Repressor*) und GCF. Der GCF bindet an GC-reiche Sequenzen und unterdrückt die Expression des Promotors in vivo und in vitro. Er scheint spezifisch für das EGFR-Promotorgen zu sein [89]. Der ETR bindet nur an einer Stelle des Promotors und hemmt ebenfalls die Expression [90].

Zur Identifizierung von bekannten Transkriptionsfaktoren, die an die Konstrukte des EGFR-Promotors binden, wurde diese per Computeranalyse bei Alibaba2.1 untersucht. Dabei entstand folgendes Ergebnis:

Diskussion

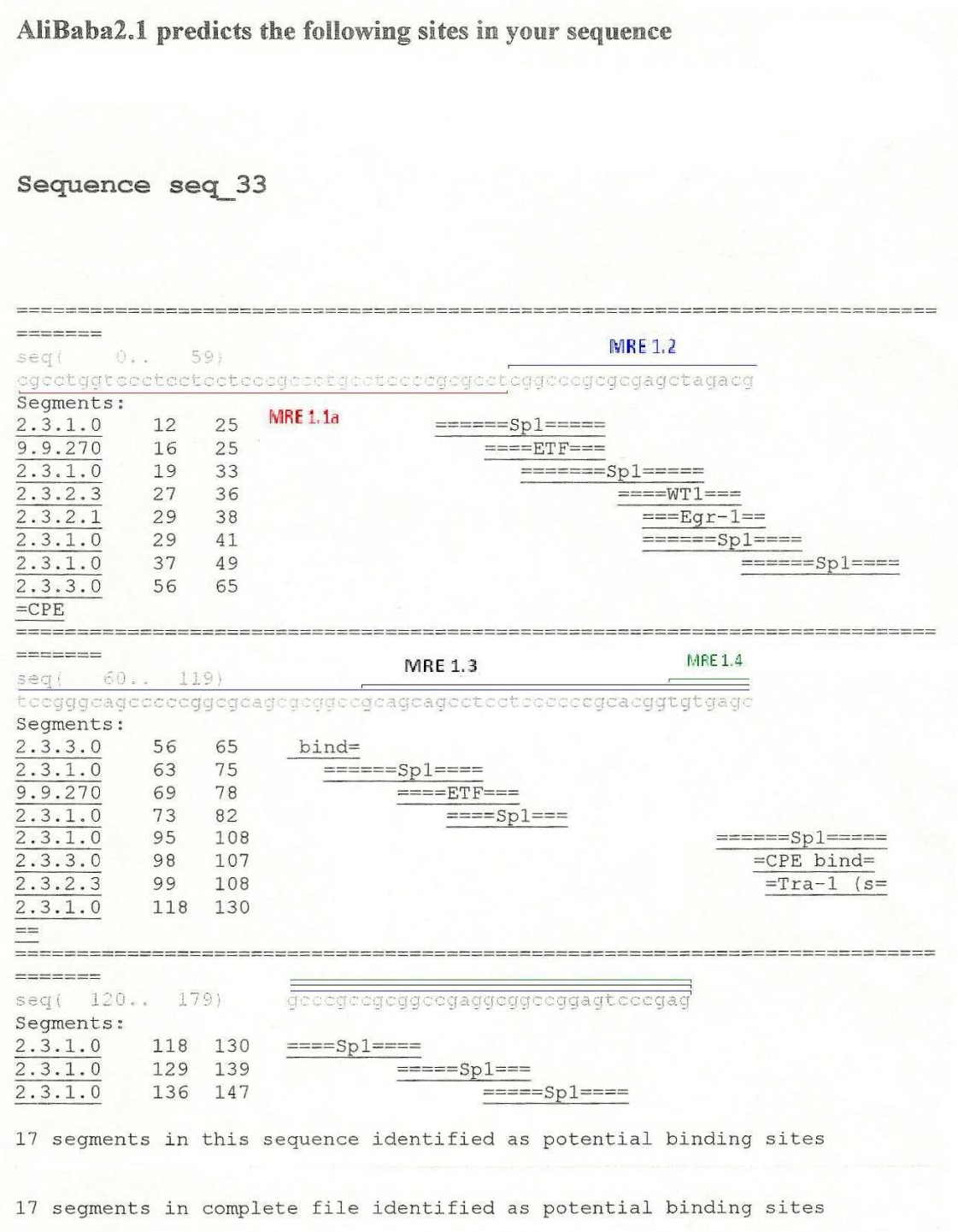

Abb. 40 Transkriptionsfaktorbindungsanalyse der MRE 1 über AliBaba2.1

In die Abbildung 40 sind die Sequenzen der Promotorkonstrukte des MRE 1 und die bindenden Transkriptionsfaktoren verzeichnet. Nachträglich wurde der Umfang der einzelnen Konstrukte farbig markiert. Deutlich ist zu erkennen, dass an den MRE 1.1a kein bekannter Transkriptionsfaktor angreift. Dies erklärt die niedrige Induktion dieses Abschnitts. An den MRE 1.2 greifen zehn Sp1-Faktoren an, an den MRE 1.3 – bei sich verkürzender DNS-Sequenz

Diskussion

- sechs Mal Sp1 und an den MRE 1.4 vier Mal Sp1. Dazu kommen noch für den MRE 1.2 zwei, für den MRE 1.3 ein ETF sowie drei weitere verschiedene Faktoren.

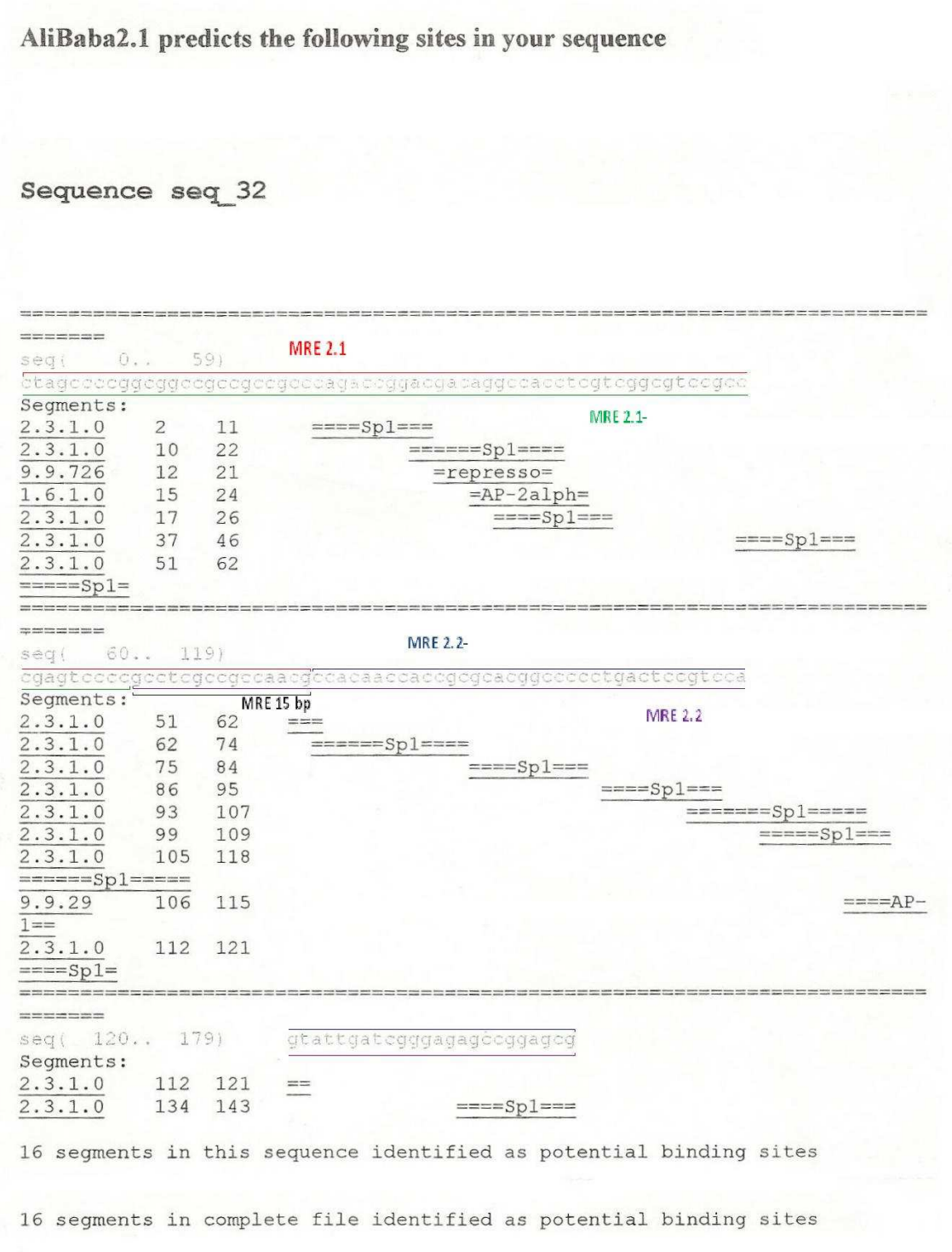

Abb. 41 Transkriptionsfaktorbindungsanalyse des MRE 2 über AliBaba2.1

Die Abbildung 41 stellt die DNS-Sequenz und die daran bindenden, bisher bekannten Transkriptionsfaktoren dar. Auch hier wurde nachträglich die Sequenz der einzelnen Konstrukte

farbig markiert. Sowohl an den MRE 2.1 als auch an den MRE 2.2 bindet je sieben Mal ein Sp1-Protein und je ein Mal ein AP-Transkriptionsfaktor. Im MRE 2.1 bindet auch ein repressives Element.

Die Ergebnisse der Transkriptionsfaktorbindungsanalyse korrelieren nur zum Teil mit denen aus den Reporter Gene Assays gewonnenen Daten. Sp1-Faktoren greifen zahlreich an die Promotorabschnitte des MRE 1 und 2 an. Prinzipiell ist eine Stimulation über diesen Faktor denkbar. Allerdings ließe sich weder die hohe Aktivität des Konstrukts MRE 15 bp erklären, noch warum im Abschnitt MRE 1 der MRE 1.3 die höchste Aktivität aufweist und nicht der MRE 1.2 mit seiner längeren Sequenz und mehr bindenden Transkriptionsfaktoren.
Auch die viel geringere Induktion des MRE 2.1minus im Vergleich zum MRE 2.1 könnte nicht erklärt werden. Möglicherweise binden an die Sequenz des MRE 1 und 2 entweder bisher unbekannte Transkriptionsfaktoren, die eine indirekte Stimulation des MR auf das enthaltende MRE ermöglichen, oder der MR bindet direkt an die DNS über eine bisher unbekannte Sequenz. Alternativ wird das MRE doch über Sp1 stimuliert und die Induzierbarkeit des MRE 1.3 gegenüber MRE 1.2 beruht auf einem größeren Verhältnis von bindenden Sp1-Faktoren zu DNS-Sequenzlänge. Vielleicht sind auch noch unbekannte hemmende Faktoren involviert, die nur am MRE 1.2 angreifen können. Eine solche Situation könnte auch das Ergebnis der geringen Induktion des MRE 2.1minus erklären.

Zur Überprüfung der genannten Möglichkeit einer direkten Bindung über eine bisher unbekannte Sequenz bietet sich ein Vergleich der Sequenz des MRE 1.3 mit der des MRE 2.2minus an. Dabei wird eine 15 Basenpaare umfassende Sequenz auffällig. Dies sind beim MRE 2.2minus „CGCGCACGGCCCCCT“, beim MRE 1.3 „GGCGCACGCCCCCCT“ (in umgekehrter Reihenfolge). Sie unterscheiden sich nur in zwei Basen von einander und sind in jenen Promotorkonstrukten zu finden, die nach den Ergebnissen des Reporter Gene Assays als jene mit potentiellen MRE gelten.

Sollte es sich bei den eben genannten Sequenzen wirklich um ein MRE handeln, sollte sich dieses auch in anderen Mineralokortikoid-spezifischen Genen nachweisen lassen.
Das Gen NDRG2 (*N-Myc downstream regulated gene 2*) wurde in Leber und Niere nachgewiesen und ließ sich nur durch Aldosteron, nicht aber Dexamethason induzieren. Die Funktion des Gens ist unbekannt. Es zeigt aber Homologien zu Drosophila MESK2, einem Bestandteil der Ras-Kaskade [91]. Eine Untersuchung der DNS-Sequenz des Gens liefert als Ergebnis eine sehr ähnliche Basenfolge wie die beiden oben angegebenen (Pubmed, vgl. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/51511730?report=genbank&from=20554762&to=205637

75&strand=true, 08.02.2010). Die Basenpaare 7954 bis 7989 weisen folgende Sequenz auf: „GTCGCCAGCCCCCCT“. Dies sind drei unterschiedliche Basenpaare zu „GGCGCACGCCCCCCT“ des MRE 1.3 bzw. vier zu der des MRE 2.2minus. Dies macht ein enthaltendes MRE wahrscheinlich. Dieses hypothetische HRE besteht ebenfalls wie das GRE aus 15 bp, weist aber keine Struktur aus zwei Halbpalindromen auf.

4.3 Ausblick

Zur genauen Identifizierung eines MREs in den Abschnitten MRE 1 und 2 ist die Klonierung weiterer Promotorkonstrukte unumgänglich. Sowohl der MRE 1 als auch der MRE 2 sollten weiter in kleinere Fragmente unterteilt werden. Beim MRE 1 bietet sich eine Untersuchung des MRE 1.3 ohne DNS des MRE 1.4 an, wie bereits beschrieben. Auch der MRE 2.2minus sollte weiter unterteilt werden.

Weitere Reporter Gene Assays sollten mit den als potentielle MREs identifizierten Sequenzen stattfinden. Eine Induktion der Transkription und Translation des EGFR nur mit diesen 15 Basenpaaren wäre ein starker Hinweis für ein Mineralokortikoid Responsives Element.

Weiterhin sollte die DNS-Sequenz des Promotors des EGF-Rezeptors, aber auch anderer Gene, die nur auf Mineralokortikoide, nicht aber Glukokortikoide reagieren, mittels bioinformatischer Analyse auf eventuelle Muster o. ä., die ein MRE darstellen könnten, analysiert werden.

Auch die Möglichkeit, dass der MR indirekt über (vielleicht noch nicht entdeckte) Transkriptionsfaktoren den EGFR induzieren könnte, sollte weiter verfolgt werden. Dies lässt sich mittels in-vitro- und Zelllysat-ELISAs ermitteln.

Sobald das Mineralokortikoide Responsive Element sicher identifiziert ist, können weitere Proteine bzw. deren Gene ausfindig gemacht werden, die an der Entstehung pathologischer Mineralokortikoidwirkungen ihren Anteil haben.

5. Zusammenfassung

Neben der bekannten Wirkung von Aldosteron auf die Salz- und Wasserhomöostase konnte über die Verwendung von Aldosteronantagonisten auch eine pathologische Wirkung dieses Steroidhormones in Form von Fibrose, endothelialer Dysfunktion und kardiovaskulärem Remodelling bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen nachgewiesen werden. Zur Erklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen wurde neben eine Reihe weiterer Faktoren eine Interaktion mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) postuliert. Eine Steigerung der EGFR-Expression durch den mit Aldosteron aktivierten Mineralokortikoidrezeptor (MR) konnte nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte durch Glukokortikoide nicht erreicht werden. Die Interaktion des MR mit dem Promotor des EGFR wurde auf zwei insgesamt 316 Basenpaare umfassende Sequenzen eingegrenzt. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass der MR nicht über ein Glukokortikoid Responsives Element, sondern über ein für ihn spezifisches, bisher unbekanntes Mineralokortikoid Responsives Element den EGFR-Promotor stimuliert. Ziel dieser Arbeit war es nun, das MRE auf eine enge Sequenz des Promotors einzugrenzen und möglichst die Struktur des MRE aufzudecken, sowie Aussagen über ein direktes oder indirektes Bindungsverhalten des MR zu treffen.

Dazu wurden Reporter Gene Assays an Opossumnierenzellen durchgeführt. Diese Zellen erhielten den MR, verschiedene Promotorkonstrukte mit dem Enzym sekretorische alkalische Phosphatase zur Eingrenzung des MRE sowie das bakterielle Gen LacZ als Transfektionskontrolle. Die Zellen wurden anschließend mittels Aldosteron in physiologischer Konzentration stimuliert und die Wirkung dieses Prozesses über Fluoreszenzmessung bestimmt. Die zwei Promotorkonstrukte mit 153 (MRE 1 genannt) bzw. 163 (MRE 2 genannt) Basenpaaren wurden in weitere Promotorkonstrukte unterschiedlicher Sequenz aufgeteilt. Für das erste Promotorkonstrukt MRE 1 ergab sich die höchste Stimulierbarkeit für das Konstrukt MRE 1.3 mit 65 Basenpaaren.

Beim zweiten Promotorkonstrukt MRE 2 zeigte das Konstrukt MRE 2.1 mit 84 Basenpaaren die höchste Stimulierbarkeit, aber auch das Konstrukt MRE 2.2 (75 Basenpaaren). Da sich die Sequenz dieser beiden Promotorabschnitte um 15 Basenpaare überlappt, wurde ein neues Konstrukt mit dieser DNS kloniert und überprüft. Die Reporter Gene Assays führten jedoch zu keiner großen Stimulation. Ein weiteres Promotorkonstrukt des MRE 2.1 ohne diese 15 Basenpaare zeigte ebenfalls keine große Stimulierbarkeit, sodass das Konstrukt MRE 2.2minus, also der MRE 2.2 ohne jene 15 Basenpaare, als das Promotorkonstrukt mit wahrscheinlichem MRE gilt.

Die DNS der Promotorkonstrukte MRE 1 und 2 wurden über bioinformatische Computeranalysen auf bekannte bindende Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei wurden

Zusammenfassung

mehrere Faktoren vom Typ Sp1, aber auch weitere Faktoren wie AP-1 bzw. 2 und der spezifische Faktor ETF identifiziert. Ein Vergleich der Bindungsstellen mit der Sequenz der Promotorkonstrukte erlaubte aber nur teilweise eine Erklärung der im Reporter Gene Assay erarbeiteten Ergebnisse. Ein indirektes Bindungsverhalten des MR über bekannte Transkriptionsfaktoren ist somit ebenso möglich wie über noch nicht bekannte Transkriptionsfaktoren sowie eine direkte Bindung des MR an ein potentielles MRE. Vergleichende Analysen der DNS des MRE 1.3 mit der des MRE 2.2minus führten zu einer 15 Basenpaare umfassenden Sequenz, die sich zwischen beiden Promotorkonstrukten nur um zwei Basen unterscheidet. Diese Strukturen enthalten möglicherweise ein MRE. Eine Kontrolle der Basenabfolge des ebenfalls MR-spezifischen Gens *N-Myc downstream regulated gene 2* (NDRG2) führte ebenfalls zu einer 15 Basenpaare umfassenden Sequenz mit geringen Unterschieden zu denen des EGFR-Promotors. Dieses Ergebnis ist eventuell dazu geeignet, die mittels Reporter Gene Assay und Transkriptionsfaktor Binding Analyse getroffenen Schlussfolgerungen und Hypothesen zu unterstützen.

Literaturverzeichnis

[1] Beato M Gene regulation by steroid hormones. Cell 1989 Feb 10;56 335-344.

[2] Evans R M The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 1988 May 13;240(4854):889-95.

[3] Beato M, Herrlich P and Schütz G Steroid hormone receptors: Many Actors in search of a plot. Cell 1995 Dec 15;83(6):851-7.

[4] Hu X and Funder J W The Evolution of Mineralocorticoid Receptors. Molecular Endocrinology 2006 Jul;20(7):1471-8.

[5] Bridgham J T, Carroll S M and Thornton J W Evolution of Hormone-Receptor Complexity by Molecular Exploitation. Science 2006 Apr 7;312(5770):97-101.

[6] Carroll S M, Bridgham J T and Thornton J W Evolution of Hormone Signaling in Elasmobranchs by Exploitation of Promiscuous Receptors. Molecular Biology and Evolution 2008 Dec;25(12):2643-52.

[7] Funder J W and Mihailidou A S Aldosterone and mineralocorticoid receptors: Clinical studies and basic biology. Molecular and Cellular Endocrinology 2009 Mar 25;301(1-2):2-6.

[8] Kassahn K S, Ragan M A and Funder J W Mineralocorticoid Receptors: Evolutionary and Pathophysiological Considerations. Endocrinology 2011 May;152(5):1883-90.

[9] Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L and Lombes M The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. Nuclear Receptor Signaling 2007 Nov 30;5:e012.

[10] Morrison N, Harrap S B, Arriza J L, Boyd E and Connor J M Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. Human Genetics 1990 Jun;85(1):130-2.

[11] Zennaro M C, Keightley M C, Kotelevtsev Y, Conway G S, Soubrier F and Fuller P J Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms. Journal of Biological Chemistry 1995 Sep 8;270(36):21016-20.

[12] Zennaro M C, Le Menuet D and Lombes M Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'- regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. Molecular Endocrinology 1996 Dec;10(12):1549-60.

[13] Le Menuet D, Viengchareun S, Penfornis P, Walker F, Zennaro M C and Lombes M Targeted Oncogenesis Reveals a Distinct Tissue-specific Utilization of Alternative Promoters of the Human Mineralocorticoid Receptor Gene in Transgenic Mice. Journal of Biological Chemistry 2000 Mar 17;275(11):7878-86.

[14] Zennaro M C, Farman N, Bonvalet J P and Lombes M Tissue-Specific Expression of {alpha} and {beta} Messenger Ribonucleic Acid Isoforms of the Human

Mineralocorticoid Receptor in Normal and Pathological States. Journal of Clinical Endocrinology Metabolism 1997 May;82(5):1345-52.

[15] Zennaro M C, Souque A, Viengchareun S, Poisson E and Lombes M A New Human MR Splice Variant Is a Ligand-Independent Transactivator Modulating Corticosteroid Action. Molecular Endocrinology 2001 Sep;15(9):1586-98.

[16] Rogerson F M and Fuller P J Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. Molecular and Cellular Endocrinology 2003 Feb 28;200(1-2):45-55.

[17] Pascual-Le Tallec L and Lombes M The Mineralocorticoid Receptor: A Journey Exploring Its Diversity and Specificity of Action. Molecular Endocrinology 2005 Sep;19(9):2211-21.

[18] Yang J and Fuller P J Interactions of the mineralocorticoid receptor - Within and without. Molecular and Cellular Endocrinology 2012 Mar 24;350(2):196-205.

[19] Pippal J B and Fuller P J Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. Journal of Molecular Endocrinology 2008 Dec;41(6):405-13.

[20] Arriza J L, Weinberger C, Cerelli G, Glaser T M, Handelin B L, Housman D E and Evans R M Cloning of human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor. Science 1987 Jul 17;237(4812):268-75.

[21] Yang J and Young M J The mineralocorticoid receptor and its coregulators. Journal of Molecular Endocrinology 2009 Aug;43(2):53-64.

[22] Spencer T E, Jenster G, Burcin M M, Allis C D, Zhou J, Mizzen C A, McKenna N J, Onate S A, Tsai S Y, Tsai M J and O'Malley B W Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. Nature 1997 Sep 11;389(6647):194-8.

[23] Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman M J and Lombes M The Elongation Factor ELL (Eleven-Nineteen Lysine-Rich Leukemia) Is a Selective Coregulator for Steroid Receptor Functions. Molecular Endocrinology 2005 May;19(5):1158-69.

[24] Obradović D, Tirard M, Némethy Z, Hirsch O, Gronemeyer H and Almeida O F X DAXX, FLASH, and FAF-1 Modulate Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptor-Mediated Transcription in Hippocampal Cells --Toward a Basis for the Opposite Actions Elicited by Two Nuclear Receptors? Molecular Pharmacology 2004 Mar;65(3):761-9.

[25] Edwards C R W, Burt D, Mcintyre M A, De Kloet E R, Stewart P M, Brett L, Sutanto W S and Monder C Localisation of 11 [beta]- hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. The Lancet 1988 Oct 29;2(8618):986-9.

[26] Odermatt A and Kratschmar D V Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11β-hydroxysteroid dehydrogenases: An overview. Molecular and Cellular Endocrinology 2012 Mar 24;350(2):168-86.

[27] Funder J W, Pearce P T, Smith R and Smith A I Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. Science 1988 Oct 28;242(4878):583-5.

[28] Rickard A J, Morgan J, Tesch G, Funder J W, Fuller P J and Young M J Deletion of Mineralocorticoid Receptors From Macrophages Protects Against Deoxycorticosterone/Salt-Induced Cardiac Fibrosis and Increased Blood Pressure. Hypertension 2009 Sep;54(3):537-43.

[29] Pitt B, Reichek N, Willenbrock R, Zannad F, Phillips R A, Roniker B, Kleiman J, Krause S, Burns D and Williams G H Effects of Eplerenone, Enalapril, and Eplerenone/Enalapril in Patients With Essential Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy: The 4E-Left Ventricular Hypertrophy Study. Circulation 2003 Oct 14;108(15):1831-8.

[30] Ellinghaus K Sodium and potassium balance during the administration of desoxycorticosterone in dogs with differing dietary sodium intakes. Pflugers Archiv European Journal of Physiology 1971;322(4):347-54.

[31] Connell J M C and Davies E The new biology of aldosterone. Journal of Endocrinology 2005 Jul;186(1):1-20.

[32] Davies E and MacKenzie S M Extra-adrenal production of corticosteroids. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology 2003 Jul;30(7):437-45.

[33] Kayes-Wandover K M and White P C Steroidogenic Enzyme Gene Expression in the Human Heart. Journal of Clinical Endocrinology Metabolism 2000 Jul;85(7):2519-25.

[34] Lamas M, Campos J R and Silva A G Identification of a novel glucocorticoid response unit (GRU) in the 5'-flanking region of the mouse IL-2 receptor [alpha] gene. Cytokine 1997 Dec;9(12):973-81.

[35] Trapp T and Holsboer F Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. Trends in Pharmacological Sciences 1996 Apr;17(4):145-9.

[36] Sasano H, Fukushima K, Sasaki I, Matsuno S, Nagura H and Krozowski Z S Immunolocalization of mineralocorticoid receptor in human kidney, pancreas, salivary, mammary and sweat glands: a light and electron microscopic immunohistochemical study. Journal of Endocrinology 1992 Feb;132(2):305-10.

[37] Keller-Wood M, von Reitzenstein M and McCartney J Is the Fetal Lung a Mineralocorticoid Receptor Target Organ? Induction of Cortisol-Regulated Genes in the Ovine Fetal Lung, Kidney and Small Intestine. Neonatology 2009;95(1):47-60.

[38] Shiva S, Pedram A and Fariba S Aldosterone, Hypertension, and Beyond. Iranian Journal of Kidney Diseases; 2011 Mar;5(2):71-6.

[39] Pfeiffer R, Beron J and Verrey F Regulation of Na+ pump function by aldosterone is alpha-subunit isoform specific. The Journal of Physiology 1999 May 1;516 (Pt 3):647-55.

[40] Zhang D, Yu Z y, Cruz P, Kong Q, Li S and Kone B C Epigenetics and the control of epithelial sodium channel expression in collecting duct. Kidney International 2009 Feb;75(3):260-7.

[41] Bhalla V, Soundararajan R, Pao A C, Li H and Pearce D Disinhibitory pathways for control of sodium transport: regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. American Journal of Physiology - Renal Physiology 2006 Oct;291(4):F714-21.

[42] Marney A M and Brown N J Aldosterone and end-organ damage. Clinical Science 2007 Sep;113(6):267-78.

[43] Pitt B, Zannad F, Remme W J, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J and The Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. The New England Journal of Medicine 1999 Sep 2;341(10):709-17.

[44] Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M and the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. The New England Journal of Medicine 2003 Apr 3;348(14):1309-21.

[45] Young M and Funder J W Eplerenone, But Not Steroid Withdrawal, Reverses Cardiac Fibrosis in Deoxycorticosterone/ Salt-Treated Rats. Endocrinology 2004 Jul;145(7):3153-7.

[46] Milliez P, Girerd X, Plouin P F, Blacher J, Safa, M E and Mourad J J Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. Journal of the American College of Cardiology 2005 Apr 19;45(8):1243-8.

[47] Benard L, Milliez P, Ambroisine M L, Messaoudi S, Samuel J L and Delcayre C Effects of aldosterone on coronary function. Pharmacological Reports:PR 2009 Jan-Feb;61(1):58-66.

[48] Kousteni S, Chen J R, Bellido T, Han L, Ali A A, O'Brien C A, Plotkin L, Fu Q, Mancino A T, Wen Y, Vertino A M, Powers C C, Stewart S A, Ebert R, Parfitt A M, Weinstein R S, Jilka R L and Manolagas S C Reversal of Bone Loss in Mice by Nongenotropic Signaling of Sex Steroids. Science 2002 Oct 25;298(5594):843-6.

[49] Dooley R, Harvey B J and Thomas W Non-genomic actions of aldosterone: From receptors and signals to membrane targets. Molecular and Cellular Endocrinology 2012 Mar 24;350(2):223-34.

[50] Grossmann C and Gekle M New aspects of rapid aldosterone signaling. Molecular and Cellular Endocrinology 2009 Sep 24;308(1-2):53-62.

[51] Grossmann C, Benesic A, Krug A W, Freudinger R, Mildenberger S, Gassner B and Gekle M Human Mineralocorticoid Receptor Expression Renders Cells Responsive for Nongenotropic Aldosterone Actions. Molecular Endocrinology 2005 Jul;19(7):1697-710.

[52] Haseroth K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Günther A, Herbst C, Christ M and Wehling M Rapid Nongenomic Effects of Aldosterone in Mineralocorticoid-Receptor-Knockout Mice. Biochemical and Biophysical Research Communications 1999 Dec 9;266(1):257-61.

[53] Sober S, Laan M and Annilo T MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. Biochemical and Biophysical Research Communications 2010 Jan 1;391(1):727-32.

[54] Schneider M R and Wolf E The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. Journal of Cellular Physiology 2009 Mar;218(3):460-6.

[55] Reiter J L, Threadgill D W, Eley G D, Strunk K E, Danielsen A J, Schehl Sinclair C, Pearsall R S, Green P J, Yee D, Lampland A L, Balasubramaniam S, Crossley T D, Magnuson T R, James C D and Maihle N J Comparative Genomic Sequence Analysis and Isolation of Human and Mouse Alternative EGFR Transcripts Encoding Truncated Receptor Isoforms. Genomics 2001 Jan 1;71(1):1-20.

[56] Flickinger T W, Maihle N J and Kung H J An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. Molecular and Cellular Biology 1992 Feb;12(2):883-93.

[57] Olivier M and Taniere P Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes. Current Opinion in Oncology 2011 Jan;23(1):88-92.

[58] Citri A, Skaria K B and Yarden Y The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. Experimental Cell Research 2003 Mar 10;284(1):54-65.

[59] Roskoski J The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004 Jun 18;319(1):1-11.

[60] Prenzel N, Fischer O M, Streit S, Hart S and Ullrich A The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. Endocrine-Related Cancer 2001 Mar;8(1):11-31.

[61] Sorkin A and Goh L K Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. Experimental Cell Research 2008 Oct 15;314(17):3093-106.

[62] Lo H W and Hung M C Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. British Journal of Cancer 2006 Jan 30;94(2):184-8.

[63] Yarden Y and Shilo B Z SnapShot: EGFR Signaling Pathway. Cell 2007 Nov 30;131(5):1018.

[64] Segatto O, Anastasi S and Alemà S Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors. Journal of Cell Science 2011 Jun 1;124(Pt 11):1785-93.

[65] Zwick E, Hackel P O, Prenzel N and Ullrich A The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. Trends in Pharmacological Sciences 1999 Oct;20(10):408-12.

[66] Grossmann C and Gekle M Non-classical actions of the mineralocorticoid receptor: Misuse of EGF receptors? Molecular and Cellular Endocrinology 2007 Oct 15;277(1-2):6-12.

[67] Krug A W, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildenberger S, Govindan M V, and Gekle M Aldosterone Stimulates Epidermal Growth Factor Receptor Expression. Journal of Biological Chemistry 2003 Oct 31;278(44):43060-6.

[68] Grossmann C Interaktion zwischen der Signaltransduktion von Aldosteron/ Mineralocorticoidrezeptor und epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Universitätsbibliothek der Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2007 Mar 28: S 1-155.

[69] Grossmann C, Krug A W, Freudinger R, Mildenberger S, Voelker K and Gekle M Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 2007 Jun;292(6):E1790-800.

[70] Kondo I S N Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. Cytogenetics and Cell Genetics 1983;35(1):9-14.

[71] Ishii S, Xu Y H, Stratton R H, Roe B A, Merlino G T and Pastan I Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. Proceedings of the Natinal Academy of Science of the. U.S.A 1985 Aug;82(15):4920-4.

[72] Johnson A C, Ishii S, Jinno Y, Pastan I and Merlino G T Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. Journal of Biological Chemistry 1988 Apr 25;263(12):5693-9.

[73] Min L J, Mogi M, Li J M, Iwanami J, Iwai M and Horiuchi M Aldosterone and Angiotensin II Synergistically Induce Mitogenic Response in Vascular Smooth Muscle Cells. Circulation Research 2005 Sep 2;97(5):434-42.

[74] Gekle M, Freudinger R, Mildenberger S and Silbernagl S Rapid actions of aldosterone on cells from renal epithelium: the possible role of EGF-receptor signaling. Steroids 2002 May;67(6):499-504.

[75] Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T and Matsuoka H Cardioprotective Mechanisms of Spironolactone Associated with the Angiotensin-Converting Enzyme/Epidermal Growth Factor Receptor/Extracellular Signal-Regulated Kinases, NAD(P)H Oxidase/Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1, and Rho-Kinase Pathways in Aldosterone/Salt-Induced Hypertensive Rats. Hypertension Research 2005 Nov;28(11):925-36.

[76] Krug A W, Schuster C, Gassner B, Freudinger R, Mildenberger S, Troppmair J and Gekle M Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders

Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. Journal of Biological Chemistry. 2002 Nov 29;277(48):45892-7.

[77] Johnson A C Activation of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Transcription by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Is Mediated by Activator Protein 2. Journal of Biological Chemistry 1996 Feb 9;271(6):3033-8.

[78] Kageyama R, Merlino G T and Pastan I Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoters without a TATA box. Journal of Biological Chemistry 1989 Sep 15;264(26):15508-14.

[79] Chen L L, Clawson M L, Bilgrami S and Carmichael G A sequence-specific single-stranded DNA-binding protein that is responsive to epidermal growth factor recognizes an S1 nuclease-sensitive region in the epidermal growth factor receptor promoter. Cell Growth Differentiation 1993 Dec;4(12):975-83.

[80] Mukku V R and Stancel G M Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. Journal of Biological Chemistry 1985 Aug 15;260(17):9820-4.

[81] Ludes-Meyers J H, Subler M A, Shivakumar C V, Munoz R M, Jiang P, Bigger J E, Brown D R, Deb S P and Deb S Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. Molecular and Cellular Biology 1996 Nov;16(11):6009-19.

[82] Sheikh M S, Carrier F, Johnson A C, Ogdon S E and Fornace A J Jr. Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promotor. Oncogene 1997 Aug 28;15(9):1095-101.

[83] Gonzalez E A, Disthabanchong S, Kowalewski R and Martin K J Mechanisms of the regulation of EGF receptor gene expression by calcitriol and parathyroid hormone in UMR 106-01 cells. Kidney International. 2002 May;61(5):1627-34.

[84] Thompson K L and Rosner M R Regulation of epidermal growth factor receptor gene expression by retinoic acid and epidermal growth factor. Journal of Biological Chemistry 1989 Feb 25;264(6):3230-4.

[85] Hudson L G, Santon J B, Glass C K and Gill G N Ligand-activated thyroid hormone and retinoic acid receptors inhibit growth factor receptor promoter expression. Cell 1990 Sep 21;62(6):1165-75.

[86] Sizemore N, Choo C K, Eckert R L and Rorke E A Transcriptional Regulation of the EGF Receptor Promoter by HPV16 and Retinoic Acid in Human Ectocervical Epithelial Cells. Experimental Cell Research 1998 Oct 10;244(1):349-56.

[87] Mukku V R Regulation of epidermal growth factor receptor levels by thyroid hormone. Journal of Biological Chemistry 1984 May 25;259(10):6543-7.

[88] Xu J, Thompson K L, Shephard L B, Hudson L G and Gill G N T3 receptor suppression of Sp1-dependent transcription from the epidermal growth factor receptor promoter via overlapping DNA-binding sites. Journal of Biological Chemistry 1993 Jul 25;268(21):16065-73.

[89] Kageyama, R and Pastan, I, (1-12-1989) Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. Cell 1989 Dec 1;59(5):815-25.

[90] Hou X, Johnson A C and Rosner M R Identification of an epidermal growth factor receptor transcriptional repressor. Journal of Biological Chemistry 1994 Feb 11;269(6):4307-12.

[91] Boulkroun S, Fay M, Zennaro M C, Escoubet B, Jaisser F, Blot-Chabaud M, Farman, N and Courtois-Coutry N Characterization of Rat NDRG2 (N-Myc Downstream Regulated Gene 2), a Novel Early Mineralocorticoid-specific Induced Gene. Journal of Biological Chemistry 2002 Aug 30;277(35):31506-15.

Thesen

1. Steroidhormone wirken, indem sie an den Hormonrezeptor binden und im dimerisierten Zustand an *Hormone Response Elements* in den Promotoren ihrer Zielgene angreifen und so die Expression dieser Gene steigern.

2. Der mit Glukokortikoiden aktivierte Glukokortikoidrezeptor bindet an *Glucocorticoid Response Elements* (GRE). In bestimmten Geweben werden Glukokortikoide vor der Bindung durch das Enzym 11β-Hydroxysteroiddehydrogenase 2 in inaktive Metabolite umgewandelt.

3. Der mit Aldosteron aktivierte MR wirkt auf epitheliale und nicht epitheliale Gewebe. Neben der Wasser- und Elektrolythomöostase zeigt er pathologische Wirkungen auf das Herz-Kreislauf-System wie Fibrose und vaskuläre Dysfunktion.

4. Dies geschieht über genomische und schnelle, nicht-genotrope Effekte.

5. Die pathologischen MR-Wirkungen werden teilweise über den EGFR vermittelt.

6. Der MR bewirkt eine gesteigerte Promotoraktivität des EGFR. Dabei interagiert er an zwei Lokalisationen mit den ersten 316 Basenpaaren des EGFR-Promotors.

7. Eine gesteigerte Expression des EGFR ist über Glukokortikoide nicht induzierbar. Der EGFR-Promotor enthält folglich kein GRE.

8. Die Wirkung von Aldosteron auf den EGFR ist demnach MR-spezifisch. Daraus ist zu schlussfolgern, dass im Promotor des EGFR sich ein MRE befindet.

9. Das MRE in den ersten 153 Basenpaaren des EGFR-Promotors lässt sich auf ein 65 Basenpaare-umfassendes Promotorkonstrukt eingrenzen.

10. Das MRE in den weiteren 163 Basenpaaren des EGFR-Promotors befindet sich in den letzten 60 Basenpaaren dieses Promotorabschnitts.

11. An den beiden Promotorkonstrukten des EGFR greifen eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren an. Neben allgemein stimulierenden Faktoren wie Sp1 und AP-1/2 sind dies auch spezifische Faktoren wie der ETF.

12. Der Promotor des EGFR hat keine CAAT- oder TATA-Box. Er wird über eine Reihe weiterer Faktoren, wie p53 und Phorbolester und Hormone, wie T_3-und Vitamin-D-Hormon, Calcitriol und Östrogen beeinflusst.

13. Die expressionssteigernde Wirkung der beiden Promotorkonstrukte lässt sich über die Verteilung der Bindung von Transkriptionsfaktoren nur teilweise erklären.

14. In diesen beiden Promotorkonstrukten befindet sich eine 15 Basenpaare umfassende Sequenz, die sich bei beiden Faktoren nur um zwei Basenpaare unterscheidet.

15. Diese Sequenz ließ sich mit geringen Unterschieden auch in dem ebenfalls Mineralokortikoid-spezifischen Gen NDRG2 nachweisen.

Tabellarischer Lebenslauf

Personalangaben

Name:	Trenkmann
Vorname:	Kay
Geburtsdatum:	17.08.1984
Geburtsort:	Berlin
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig
Wohnanschrift:	Sternstraße 16
	in 06108 Halle/Saale
Telefon:	0345/ 47 88 87 97
	0176/ 20 49 25 47
E- mail:	Kay.Trenkmann@web.de

Bildungsweg

1991- 1997	2. Grundschule Lichtenberg Berlin
1997- 1998	Georg-Christoph-Lichtenberg-Oberschule (Gymnasium) Berlin
1998- 2004	Archenhold-Oberschule (Gymnasium) Berlin Abschluss: Abitur Mai 2004, Note 1,7
WS 2004/05 bis SS 2009	Direktstudium an der *Medizinischen Fakultät* der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
WS 2009/2010	Forschungssemester für medizinische Promotion
2010 bis 2011-06-15	Praktisches Jahr
08./09.06.2011	Ärztliche Prüfung, Gesamtnote "gut"

Praktika

Pflegepraktika:

07/2005 bis 08/2005	Traumatologie/ Viszeralchirurgie/ Orthopädie Krankenhaus Hedwigshöhe Berlin
09/2005 bis 09/2005	Gerontopsychiatrie Krankenhaus Hedwigshöhe Berlin
02/2006 bis 03/2006	Chirurgie Sana-Klinikum-Lichtenberg Berlin

Praktika:

02/2005	EKM-Praktikum Traumatologie/Viszeralchirurgie/Orthopädie Krankenhaus Hedwigshöhe Berlin
05/2006 und 10/2006 bis 12/2006	Sektionsassistent in der Anatomie/ Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Famulaturen:

02/2007 bis 03/2007	Anästhesiologie und Intensivmedizin Universitätsklinikum Kröllwitz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
08/2007 bis 09/2008	Traumatologie/Viszeralchirurgie/Orthopädie Krankenhaus Hedwigshöhe, Berlin
07/2008 bis 08/2008	Gastroenterologie/Onkologie/Endoskopie Berufausübungsgemeinschaft Behrens/ Steudel/ Fechner, Halle
09/2008	Diagnostische Radiologie Universitätsklinikum Kröllwitz der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktisches Jahr:

02/2010 bis 06/2010	Tertial Anästhesiologie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Kröllwitz der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg
06/2010 bis 10/2010	Tertial Innere Medizin am Klinikum Männedorf/ Lehrkrankenhaus der Universität Zürich, Schweiz
10/2010 bis 01/2011	Tertial Viszeralchirurgie am Klinikum Martha-Maria Halle-Dölau

Dissertation

seit 02/2008	experimentelle Dissertation am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie mit dem Thema „*Charakterisierung des Mineralokortikoid-Response-Elements im EGFR-Promotor“* unter der Betreuung von Prof. Dr. Michael Gekle, Direktor des Instituts und Dekan der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

Arbeitsverhältnis

November2011 bis Mai 2012	Viszeralchirurgie am Carl-von-Basedow-Klinikum Saalekreis

Ergänzende Angaben

Führerschein:	Pkw	
Eigener PKW:	vorhanden	
PC- Kenntnisse:	Windows -95, -98, -Xp, -7, MS Word, MS Excel, MS Powerpoint, Internet	
Schreibmaschine:	10- Finger-System (Kurs Volkshochschule)	
Fremdsprachen:	Englisch:	Gymnasiumsstufe
	Französisch:	Schulkenntnisse
	Latein:	Latinum

_____

Kay Trenkmann

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässiger Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Doktortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vollständige Bescheinigung gemäß § 15 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

_____

Kay Trenkmann

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass diese Dissertation meinen ersten Promotionsversuch darstellt und an anderen Universitäten kein weiteres Promotionsverfahren gegen meine Person erfolgt.

_____

Kay Trenkmann

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Gekle für die Überlassung des Themas und die sehr engagierte Betreuung bedanken.

Ein großer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Dr. Grossmann für die Einarbeitung in die Methodik, Unterstützung bei Durchführung und Auswertung und die vielen hilfreichen Tipps und Ratschläge.

Außerdem möchte ich mich bei herzlich bei Frau Mildenberger für die Hilfestellungen bei Arbeiten mit Zellen und im Labor bedanken, ebenso für die große Unterstützung durch Frau Schumann und Frau Strätz bei den Reporter Gene Assays und bei Frau Rabe für die Hilfe bei der Herstellung der Plasmide.

Auch allen weiteren Mitgliedern des Labors möchte ich für die freundliche Aufnahme und das sehr angenehme Arbeitsklima danken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und besonders Frau Constanze Schmotz und Frau Franziska Enge für das Korrekturlesen und die ständige Anteilnahme und Unterstützung bei der Erarbeitung dieser Dissertation bedanken.

_____

Kay Trenkmann