

**MiR-29b als Aldosteron-regulierte microRNA in glatten
Gefäßmuskelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Maria Ilona Bretschneider
geb. am 08.10.1985 in Schlema

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert
2. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Claudia Grossmann
3. Prof. Dr. med. Christoph Korbmacher

Die Verteidigung der Dissertation erfolgte am 31. August 2016 in Halle/Saale mit der Gesamtnote *magna cum laude* (1,3).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Kurzfassung.....	1
2 Einleitung.....	2
2.1 <i>Grundlagen von Kreislauf-Erkrankungen</i>	2
2.1.1 Gefäßaufbau und Bedeutung	2
2.1.2 Der Prozess des Remodeling als Grundlage vaskulärer Erkrankungen.....	4
2.2 <i>Mineralokortikoid-Rezeptor (MR).....</i>	5
2.2.1 Aufbau des MR.....	6
2.2.2 Aldosteron – endogener Ligand des MR.....	7
2.2.3 Wirkungsweise des MR.....	8
2.2.3.1 Genomische Wirkung des MR.....	9
2.2.3.2 Nicht-genomische Wirkung des MR.....	10
2.2.4 Pathophysiologie des MR im Herz-Kreislauf-System.....	10
2.3 <i>MicroRNAs (miRs).....</i>	12
2.3.1 Biosynthese und Wirkungsweise von miRs	13
2.3.1.1 Biosynthese von miRs.....	13
2.3.1.2 Regulation der Biosynthese.....	15
2.3.1.3 Funktionsweise von miRs	16
2.3.2 Stabilität von miRs	17
2.3.3 MiRs in der Pathophysiologie des Kreislauf-System	18
2.3.4 MiR-29b.....	20
2.3.4.1 MiR-29b als Mitglied der miR-29-Familie	20
2.3.4.2 Bedeutung der miR-29b	21
2.4 <i>Zielstellung der Arbeit</i>	23
3 Material und Methoden	25
3.1 <i>Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....</i>	25
3.2 <i>Zellbiologische Methoden.....</i>	25

3.2.1	Zellkultur	25
3.2.2	Zellinkubationen	26
3.2.3	Transfektionstechniken	26
3.2.3.1	Transiente Transfektion	26
3.2.3.2	Lentivirale Transfektion	27
3.2.4	Zellzählung und Charakterisierung	29
3.3	<i>Tierstudien</i>	29
3.4	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	30
3.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA	30
3.4.2	RNA-Isolation aus Zytoplasma und Zellkern	30
3.4.3	RNA-Quantifizierung	30
3.4.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.4.4.1	DNaseI-Verdau und reverse Transkription	30
3.4.4.2	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	32
3.4.4.3	TaqMan qPCR zum Nachweis von miRs	33
3.4.4.4	Auswertung qPCR	35
3.5	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	35
3.5.1	Proteinisolation	35
3.5.2	Proteinbestimmung mittels BCA-Reagenz	35
3.5.3	Western Blot	35
3.5.3.1	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
3.5.3.2	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	36
3.5.3.3	Immunodetektion	36
3.5.4	Kollagen- und Fibronectin-ELISA	37
3.5.5	Duale Luciferase Reporter-Gen Analyse	38
3.5.6	Laktat-Dehydrogenase Nachweis	39
3.5.7	Caspase-3-Aktivitätsbestimmung	39
3.6	<i>Mikroskopie</i>	40
3.6.1	Migrationsanalyse mittels Wundheilungs-Assays	40
3.6.2	Migrationsanalyse mittels Time Lapse-Analyse	41
3.7	<i>Puffer und Lösungen</i>	41
3.8	<i>Verwendete Software und Datenbanken</i>	42

3.9	<i>Statistik</i>	43
4	Ergebnisse und Diskussion	44
4.1	<i>MiR-29b – eine Aldosteron-abhängige miR</i>	44
4.1.1	Nachweis des MR in vaskulären Zellen	44
4.1.2	Aldosteron senkt miR-29b zelltypspezifisch	44
4.1.2.1	Nachweis über die miR-Transkriptmenge.....	44
4.1.2.2	Nachweis über Reporter-Gene	46
4.1.3	Regulation der miR-29-Familie durch Aldosteron bzw. Endothelin-1 im Vergleich.....	47
4.1.4	Aldosteron beeinflusst die Expression von Mitgliedern der miR-29-Familie in der Mousaorta <i>in vivo</i>	48
4.1.5	Aldosteron wirkt über den MR auf miR-29b.....	49
4.1.6	Diskussion.....	50
4.2	<i>Untersuchungen zum Mechanismus der miR-29b-Reduktion</i>	53
4.2.1	Aldosteron hat keinen Einfluss auf das primäre Transkript	54
4.2.2	Einfluss von Aldosteron auf die Vorläufer-miRs	56
4.2.3	Aldosteron beeinflusst die Stabilität reifer miR-29b	59
4.2.4	Aldosteron reduziert miR-29b ausschließlich im Zytosol	61
4.2.5	Diskussion.....	62
4.3	<i>Wirkung von miR-29b auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen</i>	67
4.3.1	MiR-29b reduziert Komponenten der extrazellulären Matrix	67
4.3.1.1	mRNA-Gehalt	67
4.3.1.2	MiR-29b – mRNA Duplexbildung.....	69
4.3.1.3	Protein-Gehalt	70
4.3.1.4	Diskussion.....	71
4.3.2	MiR-29b vermindert die Motilität glatter Gefäßmuskelzellen	73
4.3.2.1	Wundheilungs-Assays.....	73
4.3.2.2	Migration (Einzelzellanalysen)	75
4.3.2.3	Adhärenz	77
4.3.2.4	Diskussion.....	77
4.3.3	MiR-29b reguliert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, lässt die Zellgröße jedoch unbeeinflusst.....	79
4.3.3.1	Proliferation	79

4.3.3.2	Zellgröße	80
4.3.3.3	Diskussion.....	80
4.3.4	MiR-29b verschiebt das Verhältnis zwischen Nekrose und Apoptose.....	81
4.3.4.1	Nekrose	82
4.3.4.2	Apoptose	83
4.3.4.3	Diskussion.....	84
4.3.5	Zusammenfassung des miR-29b-Einflusses auf den Phänotyp-Wechsel glatter Gefäßmuskelzellen	85
4.4	<i>Aldosteron steigert die Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch Reduktion der miR-29b</i>	87
4.4.1	Aldosteron beschleunigt die Migration	87
4.4.2	Die Wirkung von Aldosteron wird durch Konstanthalten der miR-29b aufgehoben.....	87
4.4.3	Diskussion.....	89
4.5	<i>Erreichte Transfektionsmengen an miR-29b</i>	91
4.5.1	...in primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HAoSMC)	91
4.5.2	... in immortalisierten A7r5 Zellen	94
4.5.3	Diskussion.....	94
5	Zusammenfassung und Bedeutung	96
Anhang.....	V
<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>.....</i>	<i>V</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>.....</i>	<i>XXVIII</i>
<i>Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>.....</i>	<i>XXX</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>.....</i>	<i>XXXIII</i>
<i>Danksagung.....</i>	<i>.....</i>	<i>XXXIV</i>
<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	<i>.....</i>	<i>XXXV</i>
<i>Zur Person.....</i>	<i>.....</i>	<i>XXXVI</i>

1 Kurzfassung

Ein durch das endogene Steroidhormon Aldosteron aktivierter Mineralokortikoid-Rezeptors (MR) ist ein wichtige Regulator der Salz- und Wasserhomöostase und damit des Blutdrucks im menschlichen Körper. Unabhängig davon kann er jedoch ebenfalls eine Umgestaltung von Gefäßen (Remodeling) bewirken, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen hierfür bislang ungeklärt sind. Klassischerweise wirkt der MR als Transkriptionsfaktor an Hormon-responsiven Elementen der DNA. Zusätzlich sind jedoch auch nicht-genomische Effekte auf intrazelluläre Signalwege bekannt. Eine mögliche Erklärung, für die pathologischen MR-Effekte auf Gefäße, stellen für uns microRNAs (miRs) dar. Diese kleinen endogenen RNA-Moleküle regulieren die Genexpression post-transkriptional und wurden bereits als potentielle Modulatoren in verschiedenen Gefäßerkrankungen beschrieben.

Wir konnten miR-29b als eine Aldosteron-abhängige miR identifizieren, deren Konzentration in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) sowie in der Mausaorta *in vivo*, jedoch nicht in Endothelzellen, durch das Steroidhormon verringert wurde. Dieser Abbau war abhängig von einem aktivierbaren MR und ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar. Die Expression der zwei primären Transkripte sowie der weiteren Mitglieder der miR-29-Familie blieb unbeeinflusst. Verschiedene Versuche mit einem Hemmer der RNA-Neusynthese ließen den Rückschluss zu, dass es eine genomische Komponente in der Regulation geben muss, über welche Aldosteron die reife miR-29b reduziert. Des Weiteren wurde die Rolle von miR-29b bezüglich des Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. Eine verringerte miR-29b-Menge führte zu einer erhöhten Bildung extrazellulärer Matrixkomponenten und zu einer beschleunigten Migration. Weiterhin wurde die Zellproliferation gesteigert und das Verhältnis von Apoptose zu Nekrose zugunsten der Nekrose verschoben. Die Zellgröße sowie die Adhärenz der VSMCs wurden nicht beeinflusst. Zudem konnten wir belegen, dass der durch Aldosteron gesteigerten Migration, eine miR-29b-Regulation zugrunde liegt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, dass die vaskulären pathologischen Effekte von Aldosteron zumindest teilweise über einen reduzierten Spiegel an miR-29b vermittelt werden. MiR-29b hat damit das Potenzial in der Therapie von Gefäßerkrankungen eingesetzt zu werden.

2 Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind weit verbreitet und Grundlage vieler bekannter Krankheiten wie Myokardinfarkt oder Herzversagen. Demnach stellen sie die häufigste Todesursache in den Industrienationen dar. Neben Risikofaktoren, wie Rauchen, Übergewicht, Diabetes Mellitus, Bluthochdruck oder hohem Blutcholesterol, begünstigt auch eine inadäquate MR-Aktivierung die Entstehung von Gefäßerkrankungen^{1,2}. Um eine bessere Prävention und Therapie bieten zu können, ist es von größter Bedeutung die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen genauer zu untersuchen.

2.1 Grundlagen von Kreislauf-Erkrankungen

Eine Schädigung des Gefäßsystems bedeutet nicht nur eine Einschränkung des Blutflusses, sondern am Ende eine Unterversorgung der Organe, wie Herz, Niere oder Leber. Reicht die Versorgung durch die Blutgefäße nicht aus, so kann dies zu Organversagen mit potenzieller Todesfolge führen. Maßgeblich beteiligt an der Entstehung von Gefäßerkrankungen sind Veränderungen in der Gefäßwand, insbesondere im Endothel und der glatten Muskulatur, welche zu Remodeling und Krankheitsbildern wie Arteriosklerose führen können. Diese einzelnen Faktoren sollen in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

2.1.1 Gefäßaufbau und Bedeutung

Die Hauptaufgabe von Gefäßen besteht im Bluttransport und damit in der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der einzelnen Körperorgane. In der Gefäßwand von Arterien befindet sich eine Vielzahl verschiedener Gewebsschichten und Zelltypen. In Abbildung 2-1 ist ein schematischer Aufbau dargestellt. Dabei bilden das Endothel, die Basalmembran und subendotheliales Bindegewebe die Intima. Die Membrana elastica interna stellt die Grenze zur Media dar. Die dicke Schicht der Media besteht hauptsächlich aus glatten Gefäßmuskelzellen und variablen extrazellulären Bestandteilen. Zusätzliche Schichten aus elastischem sowie kollagenhaltigem Bindegewebe

bilden die abschließende Adventitia, die zusätzlich Nerven und versorgende Gefäße (Vasa Vasorum) führt und das Gefäß in die Umgebung einbettet^{3,4}.

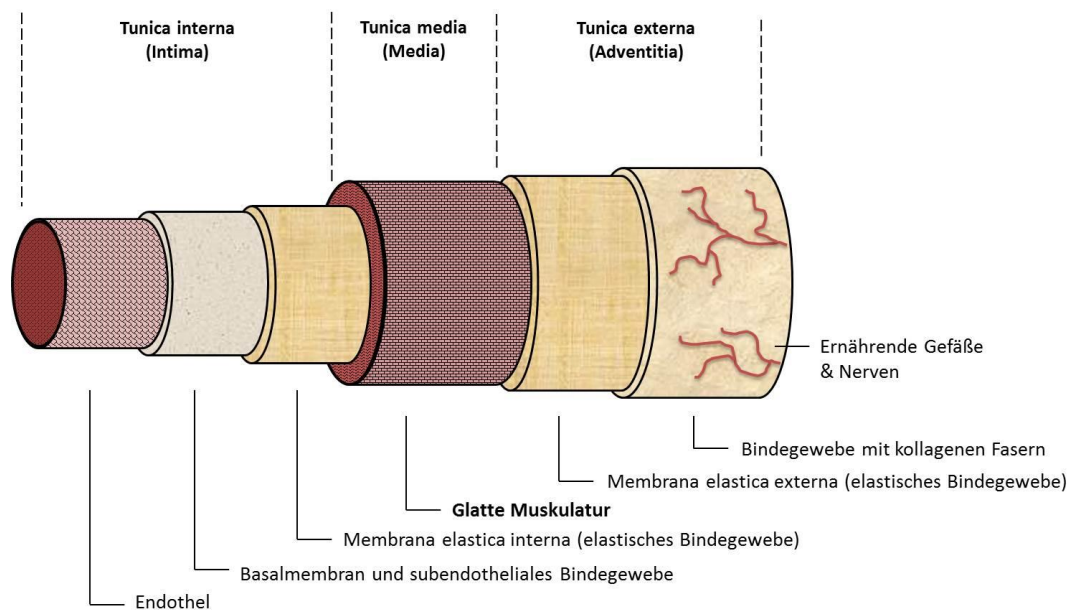


Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau von arteriellen Gefäßen des muskulären Typs.

Das zum Lumen hin abschließende Endothel dient nicht nur als Barriere, sondern trägt ebenfalls zum Austausch diverser Moleküle und Zellen bei. Dadurch hat es eine regulatorische Funktion bezüglich Gefäßhomöostase, Entzündungsregulation und Angiogenese^{5,6}. Direkt an das Endothel schließt sich die Basalmembran an, welche aus Basallamina und Lamina fibroreticularis aufgebaut ist. Die Basallamina ist zu über 95 % aus Kollagen IV aufgebaut, die Lamina fibroreticularis hauptsächlich aus Kollagen III, wobei beide maßgeblich zur Stabilität von Gefäßen beitragen. Durch die enge Verknüpfung zum Endothel ist die Basalmembran in pathophysiologische Remodeling-Prozesse sowie in die Gefäßreifung involviert. Das sich anschließende subendotheliale Bindegewebe besteht ebenfalls aus diversen Kollagenen sowie Fibronectin und Elastin^{3,7}. Durch die Membrana elastica interna getrennt, folgt auf die Intima die Media, welche hauptsächlich aus glatten Gefäßmuskelzellen besteht und den volumenmäßig größten Anteil der Gefäßwand bildet. Durch die Fähigkeit sich zu kontrahieren, besteht die Hauptaufgabe der glatten Gefäßmuskelzellen in der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und somit der Regulation des Blutdrucks. Voll ausdifferenzierte, reife Gefäßmuskelzellen exprimieren daher ein breites Repertoire an Rezeptoren, Ionenkanälen, Signaltransduktionsmolekülen, Kalzium-regulierenden Proteinen und

speziellen Proteinen, welche die Kontraktion steuern. Um dieser Aufgabe der Gefäßkontraktion konsequent nachzugehen, werden andere zelluläre Parameter, wie Migration, Proliferation oder die Bildung extrazellulärer Matrixkomponenten, auf ein Minimum reduziert^{8,9}. Diese genannten Eigenschaften beschreiben den kontraktilen Phänotyp glatter Muskelzellen, wie er in gesunden Gefäßen vorzufinden ist.

2.1.2 Der Prozess des Remodeling als Grundlage vaskulärer Erkrankungen

Das Gefäßsystem durchläuft im gesamten Leben Remodeling-Prozesse, was bedeutet, dass sich Blutgefäße durch Umgestaltung an die jeweiligen Bedingungen anpassen. Bereits in der frühen vaskulären Entwicklung spielt Remodeling eine zentrale Rolle bei der Differenzierung des endothelialen Monolayers, in der Angiogenese und Röhrenbildung sowie bei Wachstum und Fusion von Gefäßen. Doch die Fähigkeit zum Remodeling bleibt ein Leben lang bestehen. Im Erwachsenenalter adaptiert die Gefäßumgestaltung den Kreislauf hinsichtlich verschiedenster Veränderungen im Blutfluss, die z.B. durch intensives Training oder eine Schwangerschaft bedingt werden können¹⁰⁻¹². Ein dauerhaftes Remodeling jedoch fördert strukturelle Gefäßveränderungen, die sich etablieren und Grundlage vaskulärer Erkrankungen sein können, wie Arteriosklerose, Bluthochdruck oder Restenose nach Angioplastie. Die untersuchten Ursachen, welche zu Remodeling führen, sind vielfältig. So kann mechanischer Stress, wie z.B. durch eine geänderte Blutströmung, genauso Gefäßveränderungen hervorrufen wie eine Konzentrationsänderung endokriner Signalmoleküle, wie z.B. Aldosteron¹³⁻¹⁵.

Die Endothelzellen mit ihrer Position zwischen fließendem Blut und Gewebe haben dabei eine zentrale Funktion in der Wahrnehmung ihrer Umgebung. Reize durch mikrobielle Eindringlinge, Verletzungen oder zirkulierende chemische Signale werden von ihnen aufgenommen und durch verschiedene Mediatoren an die glatten Gefäßmuskelzellen weitergeleitet¹⁶. Als Antwort erfolgt eine Umgestaltung des Gefäßes. Daran können neben Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen auch Fibroblasten und Immunzellen beteiligt sein¹⁷. Glatte Gefäßmuskelzellen spielen jedoch eine zentrale Rolle, da sie, überwiegend vorhanden, durch ihre Umgestaltung die Struktur der gesamten Gefäßwand bestimmen. Zusätzlich sind diese Zellen in der Lage

unter pathologischen Umständen zu entdifferenzieren. Dieser Phänotyp-Wechsel (*phenotypic switch*) ist ein wichtiges Merkmal des vaskulären Remodeling¹⁸. Dabei erfolgt eine verstärkte Bildung und Sezernierung extrazellulärer Matrixkomponenten, wie Kollagen und Fibronektin, weshalb bei diesen glatten Muskelzellen auch vom sekretorischen Phänotyp gesprochen wird. Weiterhin zeichnen sie sich durch eine erhöhte Proliferation und Migration aus sowie durch eine erhöhte Zelltodrate, durch welche Entzündungsprozesse induziert werden^{19–22}.

Die genannten Charakteristika sekretorischer Muskelzellen sind eng involviert in die Entstehung von Arteriosklerose. Diese chronische Entzündungskrankheit beginnt meist durch eine endotheliale Dysfunktion wodurch der Endothel-Monolayer permeabel wird und die Intima von Monozyten infiltriert werden kann¹⁶. Durch Phagozytose von LDL (*low density lipoprotein*) Cholesterol oder oxidierten Phospholipiden bilden sich Schaumzellen, welche durch Nekrose Entzündungsreaktionen hervorrufen²³. Als Antwort migrieren glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima, wo sie verstärkt proliferieren und einen sogenannten Plaque bilden. Wird von diesen eingewanderten Gefäßmuskelzellen vermehrt Extrazellulärmatrix gebildet, so spricht man von einer fibrotischen Kappe²⁴. Makrophagen können zusätzlich über TNF- α - und NO-Signalwege den Zelltod glatter Muskelzellen induzieren, wodurch weitere Entzündungszellen angelockt werden^{25,26}. Diese Einwanderung von Zellen und vermehrte Matrixproduktion führt zu einer lokalen Verdickung der Gefäßwand, welche den regulären Blutfluss hindert und im Ende zu einem Schlaganfall oder Herzversagen führen kann^{27–29}.

2.2 Mineralokortikoid-Rezeptor (MR)

Der Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) gehört neben dem Glukokortikoid-Rezeptor, dem Progesteron-Rezeptor, dem Östrogen-Rezeptor und dem Androgen-Rezeptor zur Familie der klassischen Steroidhormon-Rezeptoren. Sie sind Teil der Superfamilie nukleären Rezeptoren und wirken Liganden-gesteuert als Transkriptionsfaktoren im Zellkern^{30–33}. Der MR wird in verschiedenen, hauptsächlich polarisierten epithelialen, Geweben exprimiert, wie im distalen Tubulus der Niere, dem Kolon sowie in Speichel- und Schweißdrüsen³⁴. Darüber hinaus wurde der MR auch im Nervensystem

(Hippocampus) sowie in Zellen des kardiovaskulären Systems, wie in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten, nachgewiesen^{35,36}.

2.2.1 Aufbau des MR

Das Gen des humanen MR ist auf Chromosom 4 im Abschnitt q31.1 kodiert und besteht aus 10 Exons³⁷. Auf Proteinebene weist der MR wie alle nukleären Rezeptoren vier funktionell getrennte Proteindomänen auf (Abb. 2-2)³¹.

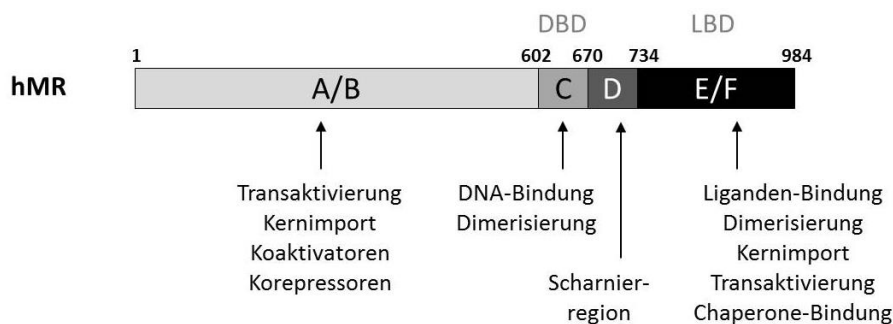


Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau des humanen MR (nach³⁸)

Die N-terminale A/B-Region mit 602 Aminosäuren ist eine nur schwach konservierte Domäne unter den Mitgliedern der Superfamilie nukleärer Rezeptoren. Die Transaktivierungsdomänen AF-1a und AF-1b in dieser Region, sowie AF-2 in der C-terminalen Domäne, sind maßgeblich an der Gesamttransaktivierungsbereitschaft des MR beteiligt³⁹. Neben diversen Korepressorbindestellen in der A/B-Domäne, sind AF-1a und AF-1b zusätzlich Bindestellen für MR-selektive Koaktivatoren⁴⁰⁻⁴². Weiterhin weist die N-terminale Domäne ein wichtiges NLS-0 (*nuclear localisation signal*) für den Kernimport auf⁴³. Die sich anschließende zentrale C-Domäne ist hoch konserviert und verfügt über zwei Zinkfinger-Motive, welche die Bindung an die DNA vermitteln (DNA-Bindedomäne, DBD) sowie zur Rezeptor-Dimerisierung beitragen³⁸. Die sich anschließende D-Domäne ist eine Scharnierregion, welche wie die A/B-Domäne nur schwach konserviert ist. Durch ihre Flexibilität kann sie DBD und Liganden-Bindungsdomäne (LBD) in räumliche Nähe bringen und dadurch die Rezeptoraktivität regulieren⁴⁴. Am C-terminalen Ende des MR befindet sich die E/F-Region, an der eine spezifische Bindung von Liganden erfolgt (LBD). In Abwesenheit eines Ligand sind diverse Chaperone wie HSP70, HSP90 und Immunophiline gebunden. Jene werden durch Ligandenbindung freigesetzt, wodurch das NLS-2 freigelegt wird, ein

Schritte⁵⁴⁻⁵⁸. Seine klassische Wirkung hat Aldosteron in den Prinzipalzellen des Sammelrohrs der Niere, wo es für die Salz- und Wasserrückresorption, sowie die Ausscheidung von K^+ -Ionen und Protonen verantwortlich ist. Zusätzlich ist bekannt, dass eine stark aktive RAAS-Kaskade, und damit ein hoher Spiegel an Aldosteron, einen pathophysiologischen Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System vermitteln kann^{59,60}. Neben dem beschriebenen zirkulierenden RAAS, wurden in verschiedenen Geweben, wie im Herz, der Niere, den Gefäßen, in Immunzellen adipösen Gewebes sowie im Nervensystem auch lokale RAA-Systeme gefunden. Es wurde beschrieben, dass sowohl das endokrine, als auch das gewebspezifische vaskuläre RAAS für die Entstehung von Gefäßerkrankungen verantwortlich sein können^{52,61-63}.

Weiterhin ist für Aldosteron bekannt, dass es sehr selektiv an den MR bindet⁶⁴. Verglichen dazu bindet Kortisol, ein Glukokortikoid, neben dem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) ebenfalls an den MR, sogar mit einer vergleichbaren Affinität wie Aldosteron. Unter physiologischen Bedingungen wäre davon auszugehen, dass der MR bevorzugt von Kortisol besetzt ist, da es in 100- bis 1000-fach höheren Plasmakonzentrationen vorliegt als Aldosteron⁶⁵⁻⁶⁷. In den Zielgeweben von Aldosteron wird daher die 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (11β -HSD2) exprimiert, welche Kortisol in Kortison umwandelt, welches den MR nicht mehr binden kann. Dadurch wird die Aldosteronspezifität für den MR aufrechterhalten⁶⁸⁻⁷⁰. Zielgewebe von Aldosteron sind jene, die den MR in vergleichsweise hoher Konzentration exprimieren. Neben den klassischen epithelialen Geweben weisen auch Regionen des Nervensystems oder des kardiovaskulären Systems eine relativ hohe MR-Menge auf^{38,71}. Es wird angenommen, dass sich in diesen nicht-klassischen Geweben die Rolle des MR und damit der genaue Mechanismus der Aldosteronwirkung sehr stark von denen in epithelialen Geweben unterscheidet⁷².

2.2.3 Wirkungsweise des MR

Der MR als Vertreter der Steroidhormon-Rezeptoren wirkt wie alle Mitglieder dieser Familie klassischerweise als Transkriptionsfaktor. Seit geraumer Zeit sind jedoch zusätzliche nicht-genomische MR-Mechanismen bekannt, welche die Bedeutung und Variabilität der MR-Wirkung erweitern.

2.2.3.1 Genomische Wirkung des MR

Im inaktiven Zustand liegt der MR als Monomer im Zytosol vor. Dabei halten ihn HSP70, HSP90 und das Immunophilin FKBP-52 in einer hoch affinen Konformation für die Ligandenbindung und verhindern eine unspezifische Aktivierung^{47,73,74}. Bindet ein Ligand an den MR erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch der Rezeptor aktiviert wird. Diese Strukturänderung ist essentiell für die Translokation in den Zellkern, die Dimerisierung genauso wie für die Interaktion mit der DNA und Koregulatorproteinen⁷⁵. Klassischerweise bildet der MR Homodimere, in seltenen Fällen auch Heterodimere mit dem GR⁷⁶. Der dimerisierte Rezeptor wirkt als Transkriptionsfaktor an Hormon-responsiven Elementen (HRE) von Zielgenen. Während für alle Mitglieder der Steroidhormon-Rezeptor-Familie spezifische HREs charakterisiert wurden, wurde ein selektives MR-responsives Element noch nicht beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass der MR an diverse GR-responsive Elemente (GRE) binden kann, was nicht verwundert, da MR und GR über 94 % Homologie in ihrer DNA-Bindedomäne (DBD) aufweisen^{67,77,78}. Der genaue Mechanismus, wie MR und GR dennoch unterschiedliche Genexpressionsmuster bewirken, ist noch weitestgehend ungeklärt. Ein möglicher Regulationsansatz könnte in der Ligandenbindung zu finden sein. Verschiedene Liganden bewirken demnach unterschiedliche allosterische MR-Konformationen, welche selektiv mit DNA-responsiven Elementen sowie mit verschiedenen Koregulatorproteinen interagieren und so die Genexpression steuern⁷⁹. Einen weiteren Erklärungsansatz liefern nicht-genomische MR-Effekte, welche über die Regulation intrinsischer Signalwege die Zellhomöostase beeinflussen, bzw. MR-abhängige miRs, die die Genexpression posttranskriptional steuern können (siehe 2.3).

Durch die genomische MR-Wirkung sind besonders Gene reguliert, welche in den Salz- und Wasserhaushalt involviert sind. Diese Aldosteron-abhängigen Gene sind z. B. verschiedene Untereinheiten des ENaC (epithelialer Natriumkanal), die Na⁺-K⁺-ATPase, CHIF (Kanal-induzierender Faktor) oder die SGK-1 (Serum Glukokortikoid-regulierte Kinase 1)⁸⁰⁻⁸⁴. Des Weiteren bewirkt Aldosteron eine Expression verschiedener Moleküle intrazellulärer Signalkaskaden und beeinflusst dadurch indirekt die Zellhomöostase. Dazu zählen das K-ras-2A (Kirsten Ras-bindendes Protein 2A) sowie das NDRG2 (N-Myc downstream-reguliertes Gen 2)^{85,86}.

2.2.3.2 Nicht-genomische Wirkung des MR

Nicht-genomische Aldosteroneffekte sind bereits nach kürzester Zeit (Minuten-Bereich) detektierbar und können deswegen nicht durch eine genomische MR-Wirkung erklärt werden. Des Weiteren kennzeichnet nicht-genomische Effekte, dass sie weder durch Transkriptions- (Actinomycin D) noch Translationshemmer (Cycloheximid) beeinflussbar sind ⁸⁷. Diese schnellen Aldosteroneffekte konnten sowohl in klassischen epithelialen wie auch in nicht-klassischen Zielgeweben des MR, wie dem kardiovaskulären System, nachgewiesen werden ⁸⁸. Ein Einfluss der nicht-genomischen Aldosteron-MR-Wirkung auf diverse intrazelluläre Signalkaskaden wurde in verschiedenen Geweben charakterisiert. Darunter sind die Einflüsse auf Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), die Proteinkinase C, *second messenger* wie Ca^{2+} -Ionen, cAMP und Stickstoffmonoxid (NO) sowie die c-Src-vermittelte Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) am häufigsten beschrieben ^{87,89-91}. Für glatte Gefäßmuskelzellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Aldosteron-aktiverter MR über Phosphoinositol-3-Kinase und ERK1/2-Aktivierung eine proliferative und vasokonstriktive Wirkung vermittelt und dadurch den Gefäßtonus beeinflusst ⁹². Im Allgemeinen kann Aldosteron durch nicht-genomische Modulation intrinsischer Signalwege Einfluss auf Wachstum, Differenzierung, Zellüberleben oder Motilität nehmen ⁸⁹.

Darüber hinaus kann Aldosteron MR-unabhängige Mechanismen vermitteln ⁹³. Die Identität eines zusätzlichen Aldosteronrezeptors wird diesbezüglich vermutet, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Es wurden Signalmoleküle identifiziert, durch welche Aldosteron seine schnellen Effekte MR-unabhängig vermitteln kann. So ist in glatten Muskelzellen die Expression des G-Protein gekoppelte Rezeptors 30 direkt in die nicht-genomische Aldosteronwirkung involviert ⁹⁴. Weiterhin kann Aldosteron direkt die C2 Domäne der Proteinkinase C α (PKC α) binden und dadurch ihre Autophosphorylierung bewirken ⁹⁵.

2.2.4 Pathophysiologie des MR im Herz-Kreislauf-System

Neben der klassischen Wirkung in epithelialem Gewebe, verursacht der MR auch pathophysiologische Effekte in nicht-epithelialem Gewebe wie dem Herz-Kreislauf-

system. Die kardiovaskuläre Pathophysiologie wird divers diskutiert und kann neben einer inadäquaten MR-Aktivierung auch über eine erhöhte Aldosteronmenge vermittelt werden ⁹⁶. Die erste groß angelegte klinische Studie war die *Randomized Aldactone Evaluation Study* (RALES), mit Herzinsuffizienz-Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion. Durch Gabe des MR-Antagonisten Spironolakton konnte die Mortalität sowie die Morbidität signifikant reduziert werden ⁹⁷. Bestätigt wurden diese Daten in der *Eplerenone-Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study* (EPHESUS), bei der Patienten mit dem MR-Antagonisten Eplerenon behandelt wurden ⁹⁸. Es gibt Hinweise darauf, dass Eplerenon ein Remodeling am Herzen nicht nur verhindern, sondern sogar rückgängig machen kann ⁹⁹. An Hunden konnte durch Gabe von Eplerenon eine bereits bestehende verzögerte Ventrikelaktivität, interstitielle Fibrose sowie eine erhöhte Expression von IL-6 und TNF- α partiell revidiert werden ¹⁰⁰. Eplerenon sowie Spironolakton finden in der Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen aktiv Anwendung und werden allein oder in Kombination mit anderen RAAS-Inhibitoren eingesetzt ^{101,102}. Die genannten Studien zeigen die pathologische Bedeutung der MR-Aktivierung im kardiovaskulären System, unabhängig von erhöhten Aldosteronkonzentrationen oder einem veränderten Blutdruck. Die MR-Aktivität hat demnach selbst großen Einfluss auf Remodeling, Fibrose, oxidativen Stress sowie die Aktivierung von pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Signalwegen ^{103,104}. Der zugrunde liegende Mechanismus der MR-Aktivierung ist diesbezüglich noch nicht geklärt. Weitere Belege liefern Studien von Rocha et al. die im Rattenmodell zeigen konnten, dass eine MR-Blockade durch Spironolakton ohne Blutdruckänderungen einen protektiven Effekt auf Gefäße und Endorgane hat ¹⁰⁵. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Aldosteron-abhängige MR-Wirkung durch hohe Salzaufnahme weiter verstärkt wird ¹⁰⁶⁻¹⁰⁹. Eine direkte Involvierung des MR in die Blutdruckregulation konnte gewebespezifische in glatten Gefäßmuskelnzellen (VSMC) belegt werden. Mäuse mit SMC-spezifischer MR-Deletion zeigten einen verminderten Blutdruck, jedoch keine Defizite im Salz- und Wasserhaushalt oder der Struktur ihrer Gefäße ¹¹⁰.

Eine inadäquate MR-Aktivierung durch erhöhte Aldosteronkonzentrationen ist ebenfalls Mediator kardiovaskulärer Erkrankungen ¹¹¹. Hyperaldosteronismus ist eine bekannte Ursache für resistenten Bluthochdruck ¹¹². Dies ist zum Teil begründet in der natürlichen Volumen-vergrößernden Wirkung von Aldosteron, teilweise jedoch auch

durch eine Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstands^{113,114}. Weiterhin konnte nach vorangegangenen Tierversuchen gezeigt werden, dass eine erhöhte Aldosteronkonzentration auch im Menschen zur Hypertrophie des linken Ventrikels und einer interstitiellen Fibrose im Herzen führen kann^{115,116}. In murinen Kardiomyocyten konnten Aldosteron-induzierte Remodeling-Effekte gezeigt werden in Abhängigkeit von normaler Salzaufnahme und Überexpression der 11 β -HSD2, welche MR-inaktives Kortison bereitstellt. Die resultierende inadäquate Aktivierung des MR durch Aldosteron sowie das beobachtete Remodeling konnten durch Eplerenon revidiert werden.¹¹⁷ Weitere *in vivo* Studien zeigen, dass Spironolaktone ein Aldosteron-bedingtes Remodeling im Rattenherzen bzw. Gefäßverdickungen und Entzündungen in der Mausvene verhindert kann^{118,119}. Inhibitoren der Aldosteronsynthese werden daher gezielt erforscht um das Aldosteron-bedingte Krankheitsbild zu therapieren^{120,121}.

Die vaskulären Krankheitsbilder und Mechanismen einer inadäquater MR-Aktivierung und eines Aldosteronüberschusses sind eng miteinander verknüpft und nicht klar trennbar. Die zugrunde liegenden pathologischen Prozesse beinhalten diverse Parameter wie Kollagenbildung, Inflammation, oxidativen Stress, die Entstehung von Arteriosklerose oder endotheliale Fehlfunktion^{104,114,122,123}. So wurde beschrieben, dass Aldosteron in glatten Gefäßmuskelzellen die Expression und Aktivität der NADPH Oxidase erhöht und damit die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bewirkt¹²⁴. Ein erhöhter oxidativer Stress wiederum kann neben einer Vasokonstriktion auch die Kollagenproduktion in glatten Gefäßmuskelzellen Aldosteron-abhängig steigern^{92,125,126}. Im kardialen Remodeling wird durch Aldosteron besonders die Synthese von Kollagen I und III gefördert^{127,128}. Zusätzlich wird die Expression von Entzündungsmarkergenen wie TNF α (Tumor-Nekrose-Faktor α), COX2 (Cyclooxygenase 2) oder Osteopontin erhöht^{117,129}. Die genauen molekularen Mechanismen, über welche Aldosteron und der MR ihre Pathophysiologie im Herz-Kreislauf-System vermitteln, sind bislang unvollständig geklärt.

2.3 MicroRNAs (miRs)

MicroRNAs (miRs) sind eine Klasse konservierter nicht-kodierender RNA-Moleküle. Sie werden endogen produziert und waren wegen ihrer Größe, von zirka 22

Nukleotiden, lange Zeit unbekannt. Nach ihrer Entdeckung 1993 in *C. elegans* entwickelten sich miRs schnell zu einem neuen Forschungsgebiet und wurden auch in diversen Pflanzen und Säugetieren nachgewiesen^{130,131}. Ihre Bedeutung liegt in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression, wodurch miRs physiologische wie auch pathophysiologische Prozesse beeinflussen können. Wichtige Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Metabolismus, Zelltod, Entwicklung und das Altern unterliegen somit der Steuerung dieser kleinen RNA-Moleküle¹³²⁻¹³⁵. Für rund 55 % der miRs aus *C. elegans* wurden humane Homologe charakterisiert, was eine bedeutsame Rolle von miRs in der Evolution bestätigt¹³⁶. Es wird vermutet, dass zirka 30 - 40 % des Genoms durch diese kleinen endogenen RNA-Moleküle in Säugetieren reguliert werden¹³⁷. Für den Menschen wurden bislang 2603 verschiedene miRs sequenziert (www.mirbase.com, November 2015).

2.3.1 Biosynthese und Wirkungsweise von miRs

2.3.1.1 Biosynthese von miRs

Die Biosynthese von miRs beinhaltet nukleäre sowie zytosolische Prozessierungsschritte und wird durch verschiedene Regulatormoleküle beeinflusst (Abb. 2-4)¹³⁸. Rund 37 % aller humanen miR-Gene kommen in sogenannten *Clustern*, einer polycistronischen Transkriptionseinheit, vor. Obgleich die Sequenzen verschiedener miRs dabei mehrere tausend Basenpaare voneinander entfernt liegen können, sind die Gene einem gemeinsamen Promotor unterstellt¹³⁹. Die Transkription der miR-Gene wird durch die RNA-Polymerase II (Pol II) vermittelt, in seltenen Fällen auch durch die Pol III^{140,141}. Durch Pol II-assoziierte Transkriptionsfaktoren erfolgt eine komplexe Regulation der Transkription, die Spezifitäten unter verschiedenen Konditionen und in diversen Zelltypen zulässt¹⁴². Das primäre Transkript (pri-miR) wird strukturell und funktionell wie eine *messenger* RNA (mRNA) prozessiert und erhält eine 5'-Methylierung (*Cap*) sowie eine Polyadenylierung am 3'-Ende¹⁴³.

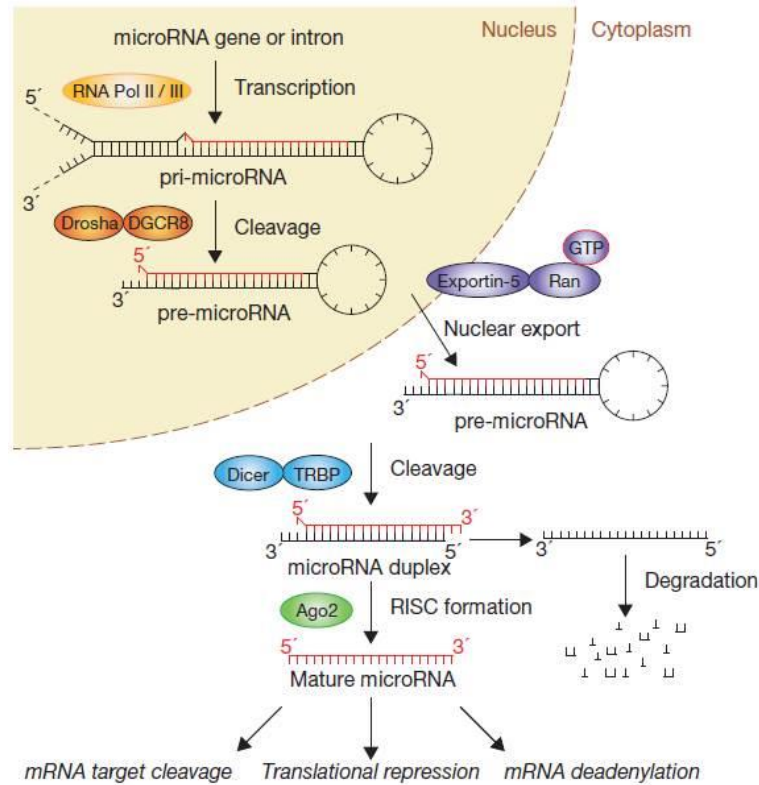


Abbildung 2-4: MiR Biosynthese (aus ¹⁴⁴).

Eine pri-miR ist meist einige Kilobasen lang und enthält lokale Haarnadel-Strukturen (*hairpin*). Der erste Schritt in der miR-Reifung ist die Abspaltung der Haarnadel-Struktur im Bereich des RNA-Doppelstrangs von der pri-miR. Dieser Prozess wird durch das Enzym Drosha, einer nukleären RNase III, vermittelt ¹⁴⁵. Drosha bildet zusammen mit dem Cofaktor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) den sogenannten Mikroprozessor-Komplex, welcher im Menschen rund 650 kDa groß ist ^{146,147}. Die im Zellkern frei gesetzte Haarnadel-Struktur wird pre-miR (*precursor miR*) genannt ¹⁴⁸.

Anschließend erfolgt der Export aus dem Nukleus durch Exportin 5, welches den doppelsträngigen RNA-Stamm der pre-miR erkennt ^{149,150}. Wie andere nukleäre Transportrezeptoren, bindet Exportin 5 zusätzlich die GTP-gebundene Form des Cofaktors Ran im Zellkern und entlässt die transportierte pre-miR nach GTP-Hydrolyse ins Zytoplasma ¹⁵¹⁻¹⁵³. Nachfolgend wird die pre-miR geschnitten wodurch ein zirka 22-Nukleotide langer RNA-Doppelstrang entsteht. Diese Reaktion wird durch die zytosolische RNase III, Dicer genannt, katalysiert, welche gezielt die Schleifenregion in der pre-miR erkennt und kurz danach schneidet ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Dicer ist mit zwei eng

verwandten Proteinen assoziiert, TRBP (TAR RNA-bindendes Protein) und PACT (Protein Aktivator von PKR). Obgleich ihre vollständige Funktion noch nicht abschließend geklärt ist, ist bekannt, dass beide Proteine zur Stabilität des Dicer-Komplexes beitragen, dessen enzymatische Aktivität jedoch nicht beeinflussen. Zusätzlich sind sie in die Bildung des *RISC (RNA induced silencing complex) loading complex (RLC)* involviert¹⁵⁷⁻¹⁵⁹.

Im letzten Schritt der miR-Reifung kommt es zur Zusammensetzung des RISC (*RNA induced silencing complex*), welcher einen einzelsträngigen miR-Strang enthält und funktionell zu einem Abbau der Ziel-mRNA, einer Hemmung der Translation oder zur Deadenylierung der mRNA führen kann¹⁴⁴. Dazu wird der RNA-Doppelstrang zunächst mithilfe von Dicer und seinen zwei Bindeproteinen auf ein Ago-Protein geladen. Während der eine Strang des RNA-Duplexes als reife miR im Ago-Protein verbleibt, wird der komplementäre Strang (*passenger* Strang) durch die endonukleolytische Aktivität des Ago-Proteins abgebaut oder durch eine RNA-Helikase abgespalten¹⁶⁰⁻¹⁶⁴. Die thermodynamische Stabilität, vor allem am 5'-Ende, ist dabei ausschlaggebend, welcher der beiden Einzelstränge abgebaut wird. Da reife miRs auch parallel von beiden Strängen produziert werden können, ist dies jedoch kein zwingender Prozess¹⁶⁵. Im Menschen sind vier Ago-Proteine bekannt (AGO1-4), wobei alle im RISC vorkommen können und nur marginale Unterschiede im zu bindenden miR-Repertoire aufweisen. AGO1, AGO3 und AGO4 mangelt es jedoch an endonukleolytischer *slicer* (Schneide-) Aktivität, was Grundlage sein könnte, dass AGO2 das am häufigsten nachgewiesene Ago-Protein ist¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

2.3.1.2 Regulation der Biosynthese

Die Reifung von miRs kann an unterschiedlichen Punkten reguliert werden^{169,170}. Für den Mikroprozessor-Komplex wurden die DEAD-Box Helikasen p68 und p72 charakterisiert, welche als Cofaktoren die Prozessierung bestimmter miRs regulieren^{147,171}. Zudem sind sie in die Rekrutierung weiterer Effektormoleküle zum Drosha-Komplex involviert, darunter p53 oder SMAD-Proteine. Die Prozessierung bestimmter miRs wird durch p53 in Abhängigkeit von p68/p72 stimuliert¹⁷². SMAD-Proteine, als Teil des TGFβ-Signalweges, sind als Transkriptionsfaktoren in der miR-Biosynthese bekannt^{173,174}. Weiterhin können sie p68-abhängig ein bestimmtes Motiv in der Haarnadel-

Struktur von pri-miRs erkennen und die Prozessierung fördern, indem sie die Interaktion zwischen pri-miR und Drosha stabilisieren^{175,176}. Ein weiteres Regulator-molekül von pri-miRs ist das hnRNP A1 (heterogenes Ribonukleoprotein A1), welches sowohl die terminale Schleifenstruktur, wie auch den doppelsträngigen Teil einer Haarnadelstruktur erkennt und bindet. Die Aktivität des Mikroprozessor-Komplexes kann durch hnRNP A1 gefördert, jedoch auch inhibiert, werden^{177,178}. TDP-43 (Tar DNA-bindendes Protein 43) ist ein weiterer Faktor der sowohl mit dem Drosha-Komplex wie auch mit Dicer interagiert und die miR-Reifung vorantreibt^{179,180}. LIN-28, ein konserviertes RNA-Bindeprotein, kann die Reifung der let-7 erhöhen bzw. verringern, indem es sowohl Drosha wie auch Dicer beeinflusst¹⁸¹⁻¹⁸³. Ein weiterer Regulator von Dicer ist das RBM3, ein RNA-bindendes Protein, welches unter Hypoxie und Hypothermie exprimiert wird und die Reifung verschiedener miRs erhöht. Wie Studien von Pilotte et al. zeigen, bindet RBM3 direkt an pre-miRs und vermittelt vermutlich deren Assoziation mit dem Dicer-Komplex¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. MCP1 (Monozyten Chemoattraktant Protein1-induziertes Protein 1), eine durch Entzündung induzierte Nuklease, kann neben spezifischen mRNAs auch pre-miRs im Allgemeinen abbauen indem es mit dem Dicer-Komplex konkurriert¹⁸⁷. Weitere wichtige Cofaktoren, welche die Aktivität von Dicer regulieren, sind TRBP und PACT, wie unter 2.3.1.1. beschrieben wurde.

2.3.1.3 Funktionsweise von miRs

MiRs kontrollieren die Genexpression post-transkriptionell, indem sie die Translation bzw. die Stabilität von mRNAs im Zytoplasma regulieren^{188,189}. Sie binden selektiv die 3' untranslatierte Region (3'UTR) ihrer Ziel-mRNA, wobei eine zusammenhängende und perfekte Basenpaarung der Nukleotide 2 bis 8 der miR (*seed*-Sequenz) mit der Ziel-mRNA die Regulationseffizienz erhöht. Diese Bindestellen für miRs liegen meist in multiplen Kopien im 3'UTR vor, was eine effektive Inhibierung der Translation sicherstellt. In der zentralen Region des miR-mRNA-Duplexes kommt meist keine Basenpaarung zustande (*mismatch*). Ein weiteres Prinzip beruht auf einer gewissen Komplementarität im 3'-Bereich der miR. Eine perfekte Basenpaarung der miR-Nukleotide 13 bis 16 mit der mRNA gewinnt zusätzlich an Bedeutung, wenn die Basenpaarung in der *seed*-Region unvollständig ist¹⁹⁰⁻¹⁹². Die Vielfalt der Ziel-Gene,

welche durch eine bestimmte miR reguliert werden kann, begründet sich in der unvollständigen Basenpaarung. Andere regulatorische kleine RNA-Moleküle wie siRNAs (*small interfering RNAs*) können ihre Funktion nur durch perfekte Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA erreichen, regulieren dadurch jedoch meist nur ein Ziel-Gen^{193,194}. Für Mitglieder einer miR-Familie besteht häufig eine große Überlappung der potenziellen Ziel-Gene, was sich in der identischen *Seed*-Sequenz begründet. Da jedoch die 3'-Region einer miR ebenfalls in die mRNA-Bindung involviert ist, gibt es verschiedene Protein-Expressionsmuster von miRs einer Familie^{195,196}.

Ihre Wirkung vermitteln miRs über die im RISC assoziierten Ago-Proteine. AGO1 bis AGO4 können dabei die Translation der Ziel-mRNA verhindern sowie deren Deadenylierung initiieren (Abb. 2-5 B)^{197,198}. Der Mechanismus der Translationsinhibierung begründet sich in bestimmten Motiven der Ago-Proteine, die das mRNA-Cap binden und die Assemblierung von Translationsinitiationsfaktoren verhindern können^{196,199}. Die Deadenylierung hingegen wird RISC-abhängig durch die CCR4-NOT Deadenylase vermittelt und führt zur Destabilisierung der mRNA²⁰⁰⁻²⁰². Einzig AGO2 kann mRNA endonukleolytisch durch seine RNaseH-ähnliche PIWI-Domäne (*P-element induced wimpy testis domain*) abbauen (Abb. 2-5 A). Diese schneidet die mRNA zentral im miR-mRNA-Duplex^{167,168}.

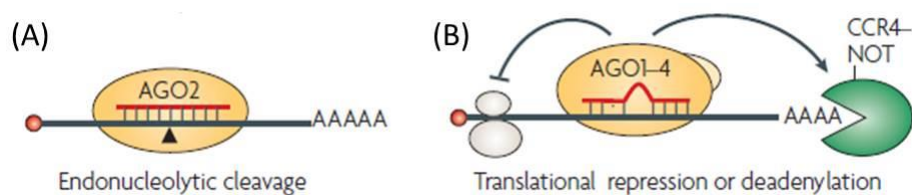


Abbildung 2-5: Wirkungsweise von miRs (nach¹⁸⁸). Während ausschließlich AGO2 seine Ziel-mRNA endonukleolytisch schneiden kann (A), können alle humanen Ago-Proteine 1 bis 4 die Translation verhindern bzw. die Deadenylierung der Ziel-mRNA bewirken (B).

2.3.2 Stabilität von miRs

Als wichtige Regulatoren der Genexpression ist die Stabilität reifer miRs von zentralem Interesse^{203,204}. Wie diverse Studien zeigen, sind miRs global betrachtet äußerst stabil mit Halbwertszeiten (HWZ) zwischen 28 h und 220 h. Damit ist die Mehrheit der miRs wesentlich stabiler als mRNAs (HWZ \approx 10 h), wodurch miRs multiple Ziel-mRNAs

regulieren können^{205,206}. Ago-Proteine sind bekannt dafür, dass sie die Menge an miRs endogen erhöhen und vor Ribonukleasen schützen können^{207,208}. Ein Stabilisierungsprotein speziell für eine einzelne miR wurde z.B. im RNA-Bindeprotein *Quaking* (QKI) charakterisiert. Dieses Protein wurde in humanen Zellen identifiziert und bindet spezifisch miR-20a, obgleich diese miR in einem Cluster exprimiert wird. Der Mechanismus wie QKI selektiv miR-20a, jedoch nicht die co-exprimierten miRs, bindet und stabilisiert ist unbekannt²⁰⁹. Weiterhin ist die Stabilität von miRs von der Zellzyklusphase einer Zelle abhängig. So ist miR-29b in HeLa Zellen während der DNA-Replikation gering exprimiert, in der Mitosephase jedoch angereichert^{210,211}. Mechanistisch gesehen ist bekannt, dass die Sequenz einer miR ihre intrinsische Stabilität regulieren kann. So wurde für miR-382 und miR-378 gezeigt, dass Mutationen in bestimmten Nukleotiden des 3'-Endes zu einer erhöhten Stabilität der miRs führen²¹². Zudem ist ein Uridin-reiches Element und dessen exakte Position für den schnellen Abbau der miR-29b verantwortlich²¹³. Für Pflanzen wurde nachgewiesen, dass Methylierungen an diversen Positionen miRs vor dem Abbau bewahren können^{214,215}.

2.3.3 MiRs in der Pathophysiologie des Kreislauf-System

Ihr einzigartiges gewebsspezifisches Expressionsmuster sowie ihre Funktion in der Genregulation machen miRs zu beliebten Markern in der humanen Pathophysiologie. Die Anzahl neu entdeckter miRs, welche während Herz-Kreislauf-Erkrankungen pathologisch reguliert sind, stieg in den letzten Jahren rasant an. So wurden veränderte miR-Expressionsmuster bei Erkrankungen der Herzkranzgefäße, Gefäßverletzung durch Angioplastie oder in aortalen Aneurysmen, wie auch im Myokard-Infarkt, Herzversagen oder arteriosklerotischen Gefäße charakterisiert²¹⁶⁻²¹⁸.

Für glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC, *vascular smooth muscle cells*), Hauptbestandteil großer Arterien, wurden diverse miRs gefunden, welche in die Zellhomöostase involviert sind. MiR-143/145 werden als Cluster exprimiert und regulieren wichtige phänotypische Eigenschaften glatter Gefäßmuskelzellen. Wie durch eine miR-143/145 Doppel-Mutanten-Maus gezeigt wurde, weisen diese Tiere einen reduzierten Blutdruck sowie eine gestörte Antwort auf vaskuläre Verletzungen auf. Weiterhin resultiert ein synthetischer Phänotyp der VSMC mit Verlust der Kontraktionsfähigkeit, was diverse

vaskuläre Erkrankungen, wie Arteriosklerose, fördert. Dabei regulieren miR-143/145 verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie KLF4 (*Krüppel like factor*), KLF5 oder ELK-1 (*ETS oncogene family*), welche in die Regulation VSMC-spezifischer Differenzierungsgene involviert sind ^{219–222}. Weiterhin wurden miR-143/145 in extrazellulären Vesikeln nachgewiesen, die der Zell-Zell-Kommunikation zwischen Endothelzellen und VSMC dienen und arterio-protectiv wirken ²²³. Für miR-21 ist bekannt, dass sie die VSMC-Proliferation reguliert, indem sie die Expression von PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) inhibiert und von Bcl-2 gefördert ²²⁴. Weiterhin erhöht miR-21, als Antwort auf TGF β und BMF4 (*bone morphogenetic factor 4*), die VSMC-Differenzierung sowie die Kontraktilität ²²⁵. In arteriosklerotischen Gefäßen konnte gezeigt werden, dass miR-21 die VSMC-Migration beeinflusst indem sie Tropomyosin 1 reduziert ²²⁶. Für Mitglieder der miR-29-Familie konnte gezeigt werden, dass sie während eines Aortenaneurysmas oder Myocardinfarkts die Synthese von Extrazellulärmatrix regulieren ^{227–230}. Weitere miRs wie miR-208, miR-221/222, miR-132 oder let-7d sind ebenfalls in die VSMC-Proliferation und Phänotyp-Differenzierung involviert ^{231–235}. Weitere Mitglieder der let-7-Familie wurden in Endothelzellen nachgewiesen, wo sie über den Rezeptor für oxLDL, die Caspase-3-Regulation oder TGF β -Signalwege die Apoptose, Migration, Entzündung sowie Monozyten-Adhäsion regulieren ^{236–238}. Für Endothelzellen wurden weitere regulierende miRs charakterisiert, welche die Angiogenese, Migration, Proliferation bzw. den Metabolismus steuern, wie z.B. miR-126, miR-210 oder miR-17-92 ^{239–243}.

Für das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), ein Hauptmediator vaskulärer Erkrankungen, werden ebenfalls miRs als Regulatoren vermutet. So regulieren miR-124 und miR-135a potenziell die Expression des MR, indem sie den 3'UTR des MR-Gens (NR3C2) binden ²⁴⁴. Weiterhin wird miR-21 und miR-24 eine Rolle in der Produktion sowie Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde zugeschrieben ^{245,246}. Im Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen zeigen Nossent et al., dass einzelne Nukleotid-Mutationen in miR-Bindestellen im 3'UTR von Genen des RAAS, nicht nur den arteriellen Blutdruck beeinflussen, sondern auch das Risiko eines Myokard-Infarkts steigern ²⁴⁷. Für miRs, welche durch den MR reguliert werden, ist bisher nur wenig bekannt. Azibani et al. belegen, dass eine hohe Aldosteronkonzentration miR-208a inhibiert und eine Herzhypertropie ohne veränderten Blutdruck bewirkt ²⁴⁸. Eine MR-

abhängige Reduktion der Konzentrationen von miR-335-3p, miR-290-5p und miR-1983 hingegen beeinflusst den Natrium-Transport durch den epithelialen Natriumkanal in der Mausniere²⁴⁹. Weiterhin bewirkt eine Stress-induzierte MR-Expression erhöhte miR-124-, miR-190-, miR-188- und miR-217-Konzentrationen im Zusammenhang mit einer Schädigung der Podozytenadhäsion²⁵⁰. VSMC-spezifische miRs, welche potenziell durch den MR reguliert werden, wurden bislang noch nicht charakterisiert.

2.3.4 MiR-29b

2.3.4.1 MiR-29b als Mitglied der miR-29-Familie

Die miR-29-Familie besteht aus den vier Mitgliedern miR-29a, miR-29b-1, miR-29b-2 sowie miR-29c, wobei miR-29b-1 und miR-29b-2 eine identische Sequenz haben und als miR-29b zusammengefasst werden. Im Menschen werden die Mitglieder dieser miR-Familie jeweils als Paare bicistronisch codiert sowie transkribiert. Während miR-29a mit miR-29b-1 auf Chromosom 7 im Abschnitt q32.3 codiert sind, befindet sich das Cluster von miR-29b-2 und miR-29c auf Chromosom 1 im Abschnitt q32.2 (Abb. 2-6 A). Die Sequenzen beider miRs in jedem Cluster liegen dabei über 1000 Basenpaare auseinander, wobei sich miR-29b-1 und miR-29b-2 jeweils *upstream* von miR-29a bzw. miR-29c befinden²⁵¹⁻²⁵³. Die reifen miR-29s haben eine hoch konservierte Sequenz im Menschen, der Maus sowie der Ratte. Zudem teilen sie sich identische Nukleotide an Position 2 bis 7, die sogenannte *seed*-Sequenz (Abb. 2-6 B). Dadurch überlappen sich die möglichen Ziel-Gene, welche durch die miR-29-Mitglieder reguliert werden können.

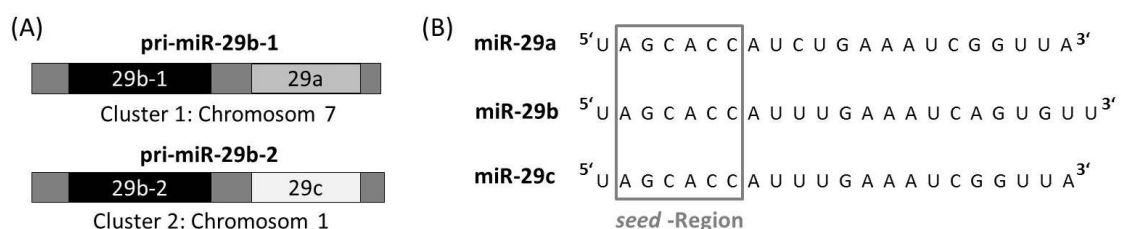


Abbildung 2-6: Mitglieder der miR-29-Familie sind in Clustern codiert und haben eine überlappende Sequenz. Während miR-29a mit miR-29b-1 im Cluster 1 codiert sind, ist miR-29b-2 mit miR-29c im Cluster 2 co-lokalisiert (A). Die Sequenzen der drei miRs überlappen sich weitestgehend. Dabei bilden die Nukleotide 2-7 die sogenannte *seed*-Region, die der Erkennung der Ziel-mRNA dient (B).

Die Expression der miR-29-Familienmitglieder kann transkriptionell sowie posttranskriptionell beeinflusst werden. So wurden in den Promotoren der zwei miR-29-Cluster diverse Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B oder Smad3 identifiziert, welche die Entstehung von Entzündung wie auch von Fibrose beeinflussen können^{253,254}. Weiterhin wurde in HeLa Zellen gezeigt, dass miR-29a konstitutiv exprimiert wird. MiR-29b unterliegt im Vergleich einem schnellen Abbau und miR-29c ist nicht signifikant nachweisbar²¹⁰. Eine hohe Expression von miR-29a, verglichen zu miR-29b und miR-29c, konnte auch in der Niere Salz-sensitiver Ratten nachgewiesen werden, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch unklar ist²⁵⁵. Für miR-29b wurde weiterhin eine Anreicherung im Nukleus nachgewiesen, im Gegensatz zu miR-29a und miR-29c. Sechs Nukleotide am 3'-Ende der miR-29b sind für den nukleären Import verantwortlich²¹⁰. Eine mögliche Funktion von miR-29b im Zellkern, wie eine regulatorische Rolle in der Transkription, im *Splicing* oder im Chromatin-Remodeling kann bislang jedoch nur vermutet werden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass CRM1, auch Exportin-1 genannt, den Nukleus-Zytoplasma-Transport der miR-29b vermittelt²⁵⁶.

2.3.4.2 Bedeutung der miR-29b

Bereits in diversen Erkrankungen des reno-kardiovaskulären Systems wurden veränderte miR-29b-Expressionen nachgewiesen. Eine signifikante Reduktion dieser miR wurde im humanen Myokard-Infarkt sowie in Patienten mit Herzversagen oder Vorhofflimmern belegt, Krankheitsbilder, welche durch Risikofaktoren wie Aldosteron begünstigt werden^{229,257,258}. Weiterhin spielt miR-29b eine wichtige Rolle in der Entstehung von Aortenaneurysmen oder Nierenfibrose^{227,228,254,255}. In der Rattenniere zeigte sich, dass eine Verringerung der 11 β -HSD2-Aktivität ebenfalls eine miR-29b-Reduktion bewirkt²⁵⁹.

Die wohl am besten beschriebene Funktion der miR-29-Familie ist die Regulation verschiedener extrazellulärer Matrixkomponenten. Dabei sind die Gene von 11 verschiedenen Kollagenen, Laminin γ 1, Fibrillin, Elastin, Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) sowie Integrin β 1 potenzielle Zieltranskripte von miR-29a, miR-29b und miR-29c^{229,255,260,261}. In der Niere von Salz-sensitiven Ratten wurde nach einer Diät mit erhöhtem Salzgehalt eine gesteigerte miR-29b-Expression detektiert. Diese stand in

direktem Zusammenhang mit einer verringerten renalen Fibrose, da miR-29b die Translation diverser extrazellulärer Matrixgene verhinderte²⁵⁵. Weitere Hinweise für einen protektiven miR-29b-Effekt in der Niere wurde im Mausmodell mit obstruktivem Nierenleiden gezeigt, wo eine tubolointestinale Fibrose mit reduziertem miR-29b-Spiegel einher ging²⁵⁴. Studien in kultivierten Tubuluszellen belegen, dass miR-29b durch TGF- β 1 und Smad3 verringert wird^{254,262}. In diversen Geweben wurde TGF- β als ein wichtiger transkriptioneller Stimulator vieler extrazellulärer Matrixgene nachgewiesen^{263–266}. So ist bereits seit längerem bekannt, dass Fibrose im Herzen durch TGF- β stimuliert werden kann²⁶⁷. *In vivo* und *in vitro* Studien belegen, dass miR-29b diverse Matrixgene antifibrotische reguliert und dadurch ein Remodeling im Herzgewebe vermindert^{229,268}. Vergleichbare Erkenntnisse wurden auch in der Aortenentwicklung von Mäusen detektiert, wo miR-29b die Expression von Elastin und weiterer extrazellulärer Matrixkomponenten gering hält²⁶⁹. In der Pathologie eines abdominalen Aortenaneurysmas (AAA), einer lokalen Weitung der Aorta, wurden erhöhte Konzentrationen an miR-29b nachgewiesen sowie eine geringe Expression von Matrixproteinen, welche maßgeblich an der Gefäßwandfestigkeit beteiligt sind. Inhibierung der miR-29b schützte vor AAA-Progression, Apoptose in der Gefäßwand und vor Mangel an extrazellulärer Matrixproteinen^{227,228}. Neben Niere, Herz und Gefäßen sind zudem auch miR-29b-abhängige fibrotische Veränderungen in Lunge und Leber beschrieben worden²⁷⁰.

Neben der Regulation fibrotischer Veränderungen, wurde ein Einfluss von miR-29b auch auf die Migration, Proliferation, den Zelltod, Differenzierung, Adhäsion, sowie die Immunantwort in Tumorzellen beschrieben, alles Prozesse, welche für das Remodeling glatter Gefäßmuskelzellen essentiell sind. So wurde in multiplen Myelomzellen nachgewiesen, dass eine miR-29b-Überexpression die Zell-Migration reduziert²⁷¹. Im Gegensatz dazu führte eine Inhibierung der miR-29b in humanen Brustkrebszellen ebenfalls zu einer verringerten Migration und wirkte Apoptose-fördernd²⁷². Dieser promigratorische Effekt der miR-29b wurde in VSMCs belegt, wo oxLDL eine gesteigerte miR-29b-Expression sowie eine erhöhte Migration bedingt, welche durch MMP-2/MMP-9 und DNA-Methylierung vermittelt wird²⁷³. Wie diverse Studien zeigen, korreliert eine Verringerung der miR-29 mit verschiedensten Tumorformen, wie Leukämie, Melanom sowie Leber-, Lungen-, Gebärmutterhals- oder Dickdarmkrebs^{274–}

²⁸⁰. In leukämischen Zellen wurde durch miR-29b-Überexpression ein verringertes Zellwachstum sowie eine pro-apoptotische Wirkung induziert ²⁸¹. Der Apoptose-fördernde und Proliferations-hemmende Effekt von miR-29b in diversen Tumoren wird vor allem durch eine gezielte Verringerung der miR-29-Zielgene, wie Mcl-1, CDK6 oder der p53-suppressiven Gene p85 α und CDK42, bewirkt ^{277,282-284}. Ein weiterer Parameter im Zellwachstum ist die Zellgröße. Diesbezüglich wurde in pathologischer linksventrikulärer Hypertrophie bei Mäusen eine verringerte miR-29a und miR-29c-Expression detektiert, während miR-29b konstant blieb ²⁸⁵. Weiterhin kann miR-29b sowohl die Differenzierung von Muskelgewebe, wie auch die von Osteoblasten fördern ^{260,286}. Bezüglich der Zelladhärenz belegen Jo et al., dass in Retinoblastoma Zellen eine verstärkte Adhärenz mit gesteigerter miR-29b-Expression einhergeht ²⁸⁷. In multiplen Myelomazellen fördert eine miR-29b-Überexpression die Zelladhärenz ebenfalls ²⁷¹. Hinsichtlich der Inflammation ist bekannt, dass miR-29b das Transkript von Interferon γ , wie auch von Interleukin-8 (IL-8) verringern kann, was die Hypothese eines entzündungshemmenden Effekts von miR-29b verstärkt ^{271,288}.

2.4 Zielstellung der Arbeit

Wie in vorangegangenen Studien gezeigt wurde, stehen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems oft im engen Zusammenhang mit einem erhöhten Aldosteronspiegel oder einem überaktivierten MR. Der zugrunde liegende Mechanismus für diese pathophysiologische Wirkung ist weitestgehend ungeklärt. MiRs sind kleine endogene RNA-Moleküle, welche post-transkriptionell die Genexpression regulieren können und deren veränderte Expression in vielen Krankheitsbildern nachgewiesen wurde. Es galt daher zu klären, ob miRs in den pathologischen Prozessen von Aldosteron und MR in VSMCs eine Rolle spielen.

Wie Vorversuche zeigten, ist miR-29b eine potenziell Aldosteron-regulierte miR in glatten Gefäßmuskelzellen. Daher sollte der Aldosteroneffekt zunächst gewebespezifisch und unter direktem Vergleich zu den miR-29-Familienmitgliedern validiert werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob Aldosteron seine Wirkung spezifisch über den MR vermittelt und ob die Expression der Vorläufer-miRs ebenfalls verändert wird. Da die Reifung der miR-29b über verschiedene Zwischenprodukte verläuft sowie eine

subzelluläre Co-Lokalisation der miR-29b beschrieben wurde, galt es die mechanistische Aldosteronregulation näher zu charakterisieren. Als weiterer Abschnitt sollte der Einfluss von miR-29b in der Aldosteron-vermittelten Pathophysiologie glatter Gefäßmuskelzellen erforscht werden. Dafür wurden verschiedene Zellparameter miR-29b-abhängig untersucht, welche in den Phänotyp-Wechsel glatter Gefäßmuskelzellen involviert sind, wie Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen, Migration, Zelladhärenz, Proliferation, Zellhypertrophie und Zellüberleben. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob Aldosteron seine Pathologie tatsächlich über eine veränderte miR-29b-Konzentration vermittelt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, von Sigma Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt) bzw. Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Substanzen waren stets von analytischer Reinheit.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden folgende Zellkulturen aortaler glatter Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen verwendet:

Tabelle 3-1: verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Spezies	Hersteller	Kultivierung
HAoSMC	humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen (Primärkultur)	Mensch	PromoCell, Heidelberg, Deutschland	Smooth Muscle Cell Growth Medium + Wachstumsfaktor-Zusatz (PromoCell)
HA-VSMC	humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen (immortalisierte Zelllinie)	Mensch	ATCC, Manassas, USA	F-12K Medium (Gibco) + Wachstumszusätze + 10 % FCS
A7r5	aortale glatte Gefäßmuskelzellen (immortalisierte Zelllinie)	Ratte	ATCC, Manassas, USA	DMEM/HAM's F12 Medium + 3,5 g/l D-Glukose + 10 % FCS
HAoEC	humane aortale Endothelzellen (Primärkultur)	Mensch	PromoCell, Heidelberg, Deutschland	Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell)
EA.hy 926	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (immortalisierte Zelllinie)	Mensch	J. C. Edgell	DMEM/HAM's F12 Medium + 10 % FCS

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in Petrischalen (BD Falco, Durham, USA) bei 37°C, 5% CO₂-Sättigung und maximaler Luftfeuchte im Brutschrank (Thermo Scientific, Waltham, USA). Die Primärzellen wurden hinsichtlich ihrer mikrobiellen

Kontamination bereits von der Bezugsfirma untersucht. Das Medium aller Zelltypen wurde regelmäßig alle 5 bis 7 Tage erneuert. Eine Subkultivierung erfolgte, wenn die Zellkonfluenz erreicht war. Dazu wurden die Zellen mit einer EDTA-Lösung (0,6 mM) inkubiert um die Zell-Oberflächen- und die Zell-Zell-Kontakte zu lockern. Zum Vereinzeln und Lösen der Zellen von der Kulturschale wurden die Zellen mit einer Trypsin-Lösung (0,1 %) behandelt. Durch Zugabe von Serum-haltigem Medium wurde die Reaktion abgestoppt und die Zellsuspension für einzelne Versuche und die weitere Kultivierung angesät. Vor Beginn eines Experiments wurden die Zellen 24 h in Serum-freiem Medium ruhig gestellt. Dadurch wurden die Zellen synchronisiert und unspezifische Effekte des Serums vermieden.

3.2.2 Zellinkubationen

Die zu inkubierenden, ruhig gestellten Zellen wurden mit Aldosteron (10 nM), Endothelin (100 nM) oder DMSO als Kontrolle (1:1000) für 24 h stimuliert. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation. Weiterhin wurden Actinomycin D-Versuche durchgeführt, wodurch die *de novo* RNA-Synthese blockiert wurde, um Aussagen über die Transkriptionsregulation zu generieren. Dazu wurden HA-VSMCs entweder 1 h vor oder 20 h nach Aldosteronstimulation (10 nM) mit 5 mg/L Actinomycin D inkubiert. Die RNA-Isolation erfolgte nach 20 h bzw. im Zeitverlauf nach 0 h, 1 h, 3 h und 6 h. Weiterhin erfolgten Zellinkubationsversuche mit 5 µM Eplerenon, einem kompetitiven Inhibitor des MR. Dabei wurden die Zellen 4 h vor Aldosteron- bzw. DMSO-Stimulation mit Eplerenon inkubiert.

3.2.3 Transfektionstechniken

3.2.3.1 Transiente Transfektion

Die Methodik der transienten Transfektion beruht auf dem Prinzip, dass fremde DNA oder RNA temporär in eukaryontische Zellen eingebracht wird. Dazu nutzten wir das Transfektionsreagenz Fugene HD von Promega. Während die Transfektion der primären Zellen (HAoSMC) in Serum-haltigem Medium erfolgen musste, wurde für A7r5 Zellen Serum-freies Medium verwendet. 8 h nach der Transfektion erhielten beide Zelllinien

frisches Serum-freies Medium. In den Versuchen kamen folgende miR-Oligonukleotide zu Einsatz:

Tabelle 3-2: verwendete miR-Oligonukleotide zur Transfektion

Bezeichnung	Charakterisierung	Hersteller
scramble miR	Negativ-Kontrolle für miR-Transfektionen (basiert auf miR-67 aus <i>C. elegans</i>)	Dharmacon
miR-29b-Mimic	Kleine, chemisch modifizierte, doppel-strängige RNA-Moleküle, die die endogene miR imitieren	Ambion
miR-29b-Inhibitor	Kleine, chemisch modifizierte, ein-strängige Oligonukleotide, die die endogene miR binden und inhibieren (antisense)	Ambion
miR-29b-LNA-Inhibitor	„Locked Nucleic Acid“-System mit erhöhter Spezifität und Stabilität der miR-Inhibierung (antisense)	Exiqon

3.2.3.2 Lentivirale Transfektion

Die Generation der Lentiviren erfolgte in Zusammenarbeit mit Bianca Busch aus der Arbeitsgruppe von Prof. Hüttelmaier (ZAMED, MLU, Halle). Hierbei wurde ein pLVX-shRNA2 Plasmid mit *Crimson* als Fluoreszenzmarker und humanem U6 Promotor verwendet (Clontech, Mountain View, USA). Durch Klonierung wurden miR-29b-Spezifikationen eingebaut. Für die Überexpression wurden miR-29b-Sequenzen der reifen miR als *short hairpin* (sh) bzw. als pre-miR in den Vektor inseriert. Die angegebenen Sequenzen der pre-miR-29b (Tab. 3-3) entsprechen den Oligosequenzen, wie sie in der PCR eingesetzt wurden um das gewünschte Fragment mit *Spacern* zu generieren. Der lentivirale Inhibitionsvektor wurde hergestellt, indem spezielle miR-29b-antisense-Sequenzen eingebaut wurden (*Decoy*) (Tab. 3-3). Für die Negativ-Kontrollen wurden Überexpressions- bzw. Inhibitionssequenzen der miR-239b-5p aus *C. elegans* in den pLVX-shRNA2 Plasmid kloniert. Primäre humane glatte Gefäßmuskelzellen der Aorta (HAoSMC) wurden für 48 h mit 200 MOI oder 250 MOI (*multiplicity of transfection* ≡ Viren pro Zelle) des jeweiligen Virus transfiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für zirka eine Woche kultiviert. Nach Bestätigung einer stabilen Expression der transfizierten Plasmide wurden Versuche durchgeführt.

Für die Transfektion mittels Lentiviren gab es zwei Versuchsansätze:

Ansatz 1: HAoSMCs wurden mit je 200 MOI für 48 h transfiziert und es kamen folgende Plasmide zum Einsatz:

- miR-29b-Überexpression (Sequenz der reifen miR-29b; sh-miR-29b)
- miR-29b-Inhibierung (*Decoy*)
- Kontrolle der Überexpression
- Kontrolle der Inhibierung

Ansatz 2: HAoSMCs wurden mit je 250 MOI für 48 h transfiziert und es wurden folgende Plasmide verwendet:

- miR-29b-Überexpression (Sequenz der pre-miR-29b-1 + Spacer)
- miR-29b-Inhibierung (*Decoy*)
- Kontrolle der Überexpression
- Kontrolle der Inhibierung

Der Vorteil der lentiviralen Transfektion liegt in der langen und stabilen Expression der gewünschten Oligonukleotide, welche durch den direkten Einbau der Zielsequenzen ins Wirtszellgenom bedingt wird. Zudem erzielt eine Transfektion durch Lentiviren meist höhere Effizienzen als die transiente Transfektion.

Tabelle 3-3: lentivirale Oligo-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz
sh-miR-29b sense	GATCTGTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTTCAAGAG AAACACTGATTTCAAATGGTGCTATTTTTTG
sh-miR-29b antisense	AATTCAAAAAATAGCACCATTTGAAATCAGTGTTTCTC TTGAAAACACTGATTTCAAATGGTGCTACA
pre-miR-29b sense	CCAGATCTCAACTTTTCCTTTCTAGGTTGTCTTGG
pre-miR-29b antisense	GGGAATTCGAAGGGGTCAGCTACATGTG
decoy-miR-29b sense	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACAACACTGAT TTCAAATGGTGCTACAAGTATTCTGGTCACAGAATAC ACAACACTGATTTCAAATGGTGCTACA
decoy-miR-29b antisense	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTT GTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTGTTGTATTCTGTGA CCAGAATACTTGTAGCACCATTTGAAATCAGTGTT

Kontrollen	sh-miR-239b-5p-cel sense	GATCTGTTTGTACTACACAAAAGTACTGTTCAAGAGA CAGTACTTTTGTGTAGTACAAATTTTTTG
	sh-miR-239b-5p-cel antisense	AATTCAAAAAATTTGTACTACACAAAAGTACTGTCTCT TGAACAGTACTTTTGTGTAGTACAAACA
	decoy-miR-239b-5p-cel sense	GGATCCGGACGGCGCTAGGATCATCAACCAGTACTTT TGTGTAGTACAAACAAGTATTCTGGTCACAGAATACA ACCAGTACTTTTGTGTAGTACAAA
	decoy-miR-239b-5p-cel antisense	GAATTCTCGAGAAAAAAGACGGCGCTAGGATCATCTT GTTTGTACTACACAAAAGTACTGGTTGTATTCTGTGAC CAGAATACTTGTTTGTACTACAC

3.2.4 Zellzählung und Charakterisierung

Zur Bestimmung von Zellzahl und Zellgröße wurden Zellsuspensionen von A7r5 und HAoSMC Zellen im CASY-Zellzähler (Innovatis AG, Reutlingen) bestimmt. Für die Adhärenz wurde analysiert wieviele Zellen sich 6 h nach der Einsaat an der Kulturschale angehaftet hatten. Für alle Versuche wurden die zu untersuchenden Zellen wie beim Passagieren behandelt und 100 µl der Zellsuspension in 10 ml CASY Tone (= Lösungsreagenz) vermessen. Durch das Gerät wurden Gesamt- und Vitalzellzahl sowie die Zellgröße bestimmt.

3.3 Tierstudien

C57BL6 Mäusen wurde 600 ng/g/d Aldosteron über 14 Tage verabreicht indem ihnen eine Alzet Minipumpe implantiert wurde (nach ²⁸⁹) bzw. sie mit einer Aldosteronpaste epikutan behandelt wurden. Gleichzeitig erhielten diese Tiere eine Diät mit hohem Salzgehalt (3,5 % Salzanteil im Futter), wie auch Kontrolltiere ohne Aldosteronbehandlung. Zur RNA-Isolation wurde die isolierten Aorten der Mäuse zerkleinert und die Fragmente in TRIzol Reagenz lysiert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit TRIzol Reagenz (Invitrogen). Das zugrunde liegende Prinzip beruht auf einer Phenol-Chloroform-Extraktion, woran sich die RNA-Fällung mittels Isopropanol anschließt.

3.4.2 RNA-Isolation aus Zytoplasma und Zellkern

Die Auftrennung und Reinigung von zytoplasmatischer und nukleärer RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Kit PARISTM (Protein And RNA Isolation System) von Ambion (Life Technologies, USA). Die Zellfraktionierung wurde dabei auf 30 min verlängert.

3.4.3 RNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte in einem UV-Spektralphotometer von NanoVue (GE Healthcare) bei 260 nm.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode, die es ermöglicht beliebige DNA-Fragmente mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase *in vitro* zu amplifizieren. Dazu werden spezifische Oligonukleotide (Primer) benötigt, die das 5' und das 3'-Ende des präferierten DNA-Abschnittes definieren. In einem sich wiederholenden Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation wird das gewünschte Transkript vervielfältigt.

3.4.4.1 DNaseI-Verdau und reverse Transkription

Um die RNA-Proben von eventuellen Verunreinigungen durch genomische DNA zu befreien, erfolgte ein DNaseI-Verdau. Hierzu wurden 1 µg RNA auf 8 µL Endvolumen mit RNase-freiem Wasser verdünnt und 1 µL 10 x DNaseI-Reaktionspuffer sowie 1 µL DNaseI zugegeben (beides von New England Biolabs, Ipswich, USA). Der Verdau

erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur gefolgt von 10 min bei 70°C, um die DNaseI zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und 4 µL RNase-freies Wasser zugegeben.

Es folgte die reverse Transkription durch welche RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben wird. Im Vergleich zur genomischen DNA enthält die cDNA keine Intron-Sequenzen. Diese Übersetzung von RNA in DNA erfolgt mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT). Zu jeder umzuschreibenden RNA-Probe wurde ein Ansatz ohne RT mitgeführt, welcher in der qPCR als Negativkontrolle diente. Dazu wurde zunächst der Ansatz des DNaseI-Verdaus aufgeteilt (7 µl für +RT-Ansatz und 7 µl für -RT-Ansatz) und der Reaktionsansatz zugefügt (Tab. 3-4). 5x First-Strand Buffer, Reverse Transkriptase und DTT stammen aus dem SuperScript III Reverse Transcriptase-Kit von Invitrogen.

Tabelle 3-4: Zusammensetzung des Ansatzes zur Reversen Transkription

1x Reaktionsansatz +RT	Reagenz	1x Reaktionsansatz -RT
11,33 µl	RNase-freies Wasser	11,58 µl
4 µl	5x First-Strand Buffer	4 µl
1 µl	dNTPs (je 10 mM)	1 µl
0,67	Random Primer (0,3 µg/µl)	0,67
0,5 µl	RNase Out (40 U/µl)	0,5 µl
0,25 µl	DDT (100 mM)	0,25 µl
0,25 µl	Reverse Transkriptase (200 U/µl)	-
7 µl	RNA (Probe)	7 µl

Die reverse Transkription erfolgte im Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) in den folgenden 3 Schritten:

Tabelle 3-5: Ablauf der Reversen Transkription

Schritt	Temperatur	Dauer
Anlagerung	25°C	5 min
Gegenstrangsynthese	42°C	30 min
Enzyminaktivierung	95°C	5 min

3.4.4.2 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Methodik der quantitativen oder Echtzeit-PCR beruht auf der Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes, welcher durch Abgleich auf ein internes Referenz-Gen relativ quantifiziert werden kann. Dazu wird ein DNA-interkalierender Fluoreszenz-Farbstoff verwendet (SYBR-GreenI oder FAM) dessen Signalstärke proportional zum amplifizierten PCR-Produkt detektiert werden kann. Zum Abschluss wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur auf 95°C eine Schmelzkurve erstellt um die Reinheit der PCR-Produkte nachzuweisen. Die qPCR erfolgte unter Verwendung des Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG von Invitrogen und speziellen Primern des zu untersuchenden Gens (Tab. 3-8). Das Pipettierschema sowie die Konditionen der qPCR sind in Tabelle 3-6 und 3-7 aufgeführt. Als interne Kontrolle wurde die 18S rRNA bei jeder Probe mitbestimmt.

Tabelle 3-6: Zusammensetzung eines qPCR Ansatzes

Reagenz	1x Reaktionsansatz qPCR
Super Mix (2x)	6,25 µl
Primer sense (10µM)	0,5 µl
Primer antisense (10µM)	0,5 µl
Wasser	4,25 µl
cDNA	1 µl

Tabelle 3-7: Ablauf der qPCR

Schritt	Temperatur	Dauer	
Denaturierung der cDNA	95°C	10 min	
Denaturierung der cDNA	95°C	15 Sek	40 Zyklen
Anlagerung der Primer	T _A	30 Sek	
Elongation	70°C	30 Sek	
	95°C	15 Sek	
Schmelzkurve	60°C	15 Sek	
	95°C	15 Sek	

Tabelle 3-8: verwendete qPCR Primer

Gen-name	Genbank-ID	Sequenz 5' – 3'	Länge in bp	Anlage- rung (°C)
Col1A1	NM_000088.3	s:TCTGGCGCTCCCATGGCTCT as:GCCCTGCGGCACAAGGGATT	166	60°C
Col3A1	NM_000090.3	s:AGGGGAGCTGGCTACTTCTC as:AGGACTGACCAAGATGGGAA	95	60°C
Col4A1	NM_001845.4	s:GGTATTCCAGGATGCAATGG as:TCTCACCTGGATCACCCCTTC	124	60°C
Fibro- nektin	NM_212482.1	s: CACCGAAACCGGGAAGAG as:TTGCCTAGGTAGGTCCGTTTC	142	55°C
18S rRNA	X03205	s:GCATATGCTTGTCTCAAAGA a:CCAAAGGAACCATAACTGAT	101	55°C

3.4.4.3 TaqMan qPCR zum Nachweis von miRs

Das Prinzip der TaqMan qPCR beruht auf einer Sonde (18 - 22 Nukleotide), welche am 5'-Ende einen Fluoreszenz-Reporter und am 3' -Ende einen Quencher trägt, der das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Da die Taq-Polymerase neben der Polymerase- auch eine 5' – 3' Exonuklease-Aktivität aufweist, kommt es während der Elongation zum Abbau der Sonde. Dadurch entfernen sich Fluorophor und Quencher räumlich voneinander und

die emittierte Fluoreszenz kann detektiert und quantifiziert werden. Bereits die reverse Transkription der reifen miRs und pre-miRs erfolgt unter Verwendung von miR-spezifischen Primern, wodurch die Reinheit des PCR-Produkts erhöht werden soll.

Für die TaqMan qPCR wurden das TaqMan Reverse Transcription Kit sowie TaqMan microRNA Assays der jeweiligen miR von Invitrogen verwendet (Tabelle 3-9). Für die reverse Transkription der pre-miRs wurden spezielle *looped* Primer nach Czimmerer et al. konstruiert (Tabelle 3-10) ²⁹⁰. Als Referenz erfolgte die Bestimmung der U6 snRNA bzw. der 18S rRNA.

Tabelle 3-9: verwendete TaqMan Sonden in der qPCR

TaqMan Probe	Nachweis	Hersteller
miR-29a	reife miR	Life Technologies
miR-29b	reife miR	Life Technologies
miR-29c	reife miR	Life Technologies
pre-miR-29b-1	Vorläufer miR	Life Technologies
pre-miR-29b-2	Vorläufer miR	Life Technologies
pri-miR-29b-1	primäres miR Transkript	Life Technologies
pri-miR-29b-2	primäres miR Transkript	Life Technologies
U6 snRNA	interne Kontrolle	Life Technologies

Tabelle 3-10: RT looped Primer für pre-miR-Nachweis

RT Primer	Sequenz 5' – 3'
pre-miR-29b-1	GTTGGTTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAG CCAACCCCCAAGAACACTGATTTCAAATGGTGCTAGAC <u>AA</u>
pre-miR-29b-2	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAG CCAACCTCCTAAAACACTGATTTCAAATGGTGCTAGATA <u>CAA</u>

3.4.4.4 Auswertung qPCR

Zur relativen Quantifizierung der Produkte wurde auf die interne Kontrolle (18S rRNA bzw. U6 snRNA) normalisiert, da diese ubiquitär und homogen in den Zellen exprimiert wird. Als weiterer Abgleich erfolgte die Normalisierung zu unstimuliert bzw. unbehandelt Kontrollzellen ($\Delta\Delta C_q$ -Methode). Um zu analysieren um wie vielfach die Genexpression beeinflusst war, wurde der $2^{\Delta\Delta C_q}$ -Wert ermittelt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden die $\Delta\Delta C_q$ -Werte verwendet, da die $2^{\Delta\Delta C_q}$ -Werte nicht linear sondern logarithmisch gewichtet sind.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Proteinisolation

Für die Isolation von zellulären Proteinen wurden die jeweiligen Zellen zunächst in Pelletpuffer von der Kulturschale gelöst und für 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l RIPA-Zellysepuffer aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung homogenisiert.

3.5.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Reagenz

Zur Protein-Gehaltsbestimmung wurde der Bicichinonsäure Assay (BCA) verwendet²⁹¹. Dabei reduzieren Proteine in einem alkalischen Milieu Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen, die dann mit der Bicichinonsäure einen violetten Farbkomplex bilden. Im Versuch wurden 50 Teile BCA-Reagenz mit einem Teil $CuSO_4$ -Lösung (4 % w/v) gemischt. Zu jeweils 5 μ l der Probe wurden 200 μ l BCA-Ansatz zugegeben und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Detektion der Extinktion erfolgte im Multiwell-Reader (Sunrise, Tecan, Deutschland) bei 560 nm. Als Standardkurve zur Kalibrierung der Messwerte wurde eine BSA-Eichreihe (100 – 1000 μ g/ml) parallel vermessen.

3.5.3 Western Blot

Im Verfahren des Western Blot werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen, auf welcher sie quantitativ durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden können.

3.5.3.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurden Protein-Proben zunächst im Verhältnis 5 + 1 mit Laemmli-Puffer (6x) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Polypeptidketten können so SDS binden und erzielen eine konstant negative Ladungsverteilung, wodurch sie im elektrischen Fluss zur Anode wandern. Es wurden 8 %ige Acrylamid-Trenngele verwendet, wobei ein 3%iges Sammelgel vorgeschaltet war. Die SDS-PAGE pro Gel erfolgte im Laufpuffer bei 11 mA für 36 min zum Aufkonzentrieren der Proben, gefolgt von 22 mA für 1 h und 48 min zum Auftrennen der Proteine. Bei jedem Gel wurde ein Protein-Größenstandard (PeqGold Proteinmarker IV, PeqLab, Erlangen) aufgetragen. Alle Geräte stammten von Biometra (Göttingen).

3.5.3.2 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für den Transfer der negativ geladenen Proteine wurde ein Gerät von BioRad (München) verwendet. Auf zwei Filterpapiere wurde eine Nitrozellulosemembran (Whatman, Buckinghamshire, Großbritannien) gelegt, darauf das Protein-Gel und erneut zwei Filterpapiere. Das Filterpapier sowie die Nitrozellulosemembran wurden zuvor mit Transferpuffer angefeuchtet. Durch einen gerichteten Strom von Kathode zu Anode wurden die negativen Proteine auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren bei 2 mA pro cm² Gel für 50 min. Anschließend wurde die Membran 5 min in TBS gewaschen.

3.5.3.3 Immunodetektion

Bei der Immunodetektion wird mit Hilfe spezifischer Antikörper das zu untersuchende Protein selektiv nachgewiesen. Dafür wurde die Protein-tragende Nitrozellulosemembran zunächst für 1 h in *Blocking Solution* (5 % Milchpulver in TBS-Tween) inkubiert um unspezifische Bindungsstellen durch das Milcheiweiß abzusättigen. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit TBS-Tween gewaschen. Die Inkubation mit Erst-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in TBS-Tween mit 5 % BSA. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-Tween gewaschen und für

mindestens 2 h mit dem Zweit-Antikörper, welcher an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, in *Blocking Solution* inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS für je 5 min erfolgte die Detektion. Hierfür wurde die Membran für 1 min mit ECL (enhanced Chemolumineszenz)-Reagenz (Thermo Scientific, Waltham, USA) inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol durch H_2O_2 . Die Chemolumineszenz wurde mit einem Geldokumentationsgerät (BioRad, München) detektiert und mit der Software QuantityOne (BioRad, Hercules, USA) semi-quantitativ und im linearen Bereich ausgewertet. Als Beladungskontrollen für die Auswertung wurde HSP90 verwendet.

Tabelle 3-11: verwendete Antikörper im Western Blot

Erst-AK	Verdünnung	Hersteller	Zweit-AK	Verdünnung	Hersteller
MR	1:500	Gomez-Sanchez	Anti-mouse	1:2000	CellSignaling
HSP90	1:2000	Santa Cruz	Anti-rabbit	1:20000	Rockland

3.5.4 Kollagen- und Fibronectin-ELISA

Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) ist eine Methode zum Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper. Anhand eines enzymatisch katalysierten Farbumschlags kann die relative Menge eines Proteins ermittelt werden.

Die relativen Konzentrationen an Kollagen und Fibronectin wurde im Zellmedium nach Schwerdt et al. 2007 bestimmt ²⁹². Die zu untersuchenden Zellen wurden in 24-well-Platten angesät und transfiziert. Nach 24 h wurden Aliquote von Zellkulturüberständen gewonnen und mit 200 μ l Vollers-Puffer bei 4°C über Nacht in 96-well MaxiSorp Platten (Nunc, Dänemark) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS-Tween für je 5 min erfolgte die Inkubation in PBS-Tween mit 2 % BSA (w/v) für 2 h. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurden die Wells mit je 50 μ l Erst-Antikörper (Rockland, Gilbertsville, USA) in PBS-Tween mit 2 % BSA (w/v) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 3-12). Nach drei folgenden Waschschritten für je 5 min mit PBS-Tween erfolgte die Inkubation mit Zweit-Antikörper, welcher mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war, für 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach drei erneuten Waschschritten wurden die Wells mit 100 μ l HRP-

Substrat-Puffer inkubiert. Nach 15 min wurde die Reaktion mittels 25 μ l 1 M H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 490 nm im Multi-Well reader (Sunrise, Tecan, Deutschland) gemessen. Die Konzentrationen an Kollagen und Fibronectin wurden ermittelt, indem man eine Kalibrierungskurve bekannter Kollagen- bzw. Fibronectin-Konzentrationen erstellte.

Tabelle 3-12: verwendete Antikörper im ELISA

Erst-AK	Verdünnung	Hersteller	Zweit-AK	Verdünnung	Hersteller
Col1A1	1:1000	Rockland	Anti-rabbit	1:5000	Rockland
Col3A1	1:1000	Rockland	Anti-rabbit	1:5000	Rockland
Col4A1	1:1000	Rockland	Anti-rabbit	1:5000	Rockland
Fibronectin	1:2000	Rockland	Anti-rabbit	1:5000	Rockland

3.5.5 Duale Luciferase Reporter-Gen Analyse

Das System der dualen Luciferase Reporter-Gen Analyse beruht auf dem Einsatz zweier Luciferasen (*Firefly*- und *Renilla*-Luciferase), welche durch Lumineszenz nachweisbar sind. Während die *Firefly*-Luciferase die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin katalysiert, setzt die *Renilla*-Luciferase Coelenterazin zum ebenfalls Licht-emittierenden Produkt Coelenteramid um. Mit Hilfe dieser Luciferase-Reporter-Gene können Qualitäten und Effekte anderer, *downstream* des Reporters gelegener, Gene gezeigt werden.

Es wurden folgende Plasmide verwendet:

Tabelle 3-13: verwendete Plasmide in der Reporter-Gen Analyse

Plasmid	Luciferase	Charakterisierung	Hersteller
pGI4.74 [<i>hRluc</i> /TK]	<i>Renilla</i>	Plasmid dient der Quantifizierung und internen Transfektionskontrolle	Promega
pMiR-29b	<i>Firefly</i>	Reporter-Plamid, dass eine miR-29b-Bindestelle <i>downstream</i> des Luciferase-Gens enthält	Signosis

A7r5 Zellen wurden in 24-Well Platten angesät und mit Reporter-Plasmiden und entweder scramble-miR, miR-29b-Mimic oder miR-29b-Inhibitor in Serum-freiem Medium transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die Detektion der Lumineszenz erfolgte in den Zelllysaten unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay Systems von Promega nach Herstelleranweisungen.

3.5.6 Laktat-Dehydrogenase Nachweis

Im Verlaufe der Nekrose kommt es zur Schädigung der Zellstruktur, wodurch zytosolische Komponenten auch im Medium nachweisbar werden. Die Aktivität von Laktat-Dehydrogenase wurde als Marker für nekrotische Zellen nachgewiesen, da dieses zytosolische Enzym ubiquitär exprimiert wird und vergleichbar leicht nachzuweisen ist.

Für die Analyse wurde das Zellmedium aufbewahrt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zelllyse mit 100 µl Caspase-Lysepuffer. Die Zelllysate wurden für 10 min bei 12000 x g (4°C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Von jeder Probe wurden 5 µl Lysat und 20 µl Medium mit LDH-Substrat-Puffer inkubiert (additiv 200 µl). Der Umsatz des LDH-Substrates (NADH und Pyruvat) wurde anhand der Absorption bei 340 nm über 30 min in einem Multiwell-Reader (Sunrise, Tecan, Deutschland) gemessen. Die relative LDH-Freisetzung aus den Zellen wurde durch direkte Korrelation zu der intrazellulären LDH-Konzentration berechnet.

$$\text{LDH-Aktivität in mU/mL} = 1000 \times (\Delta E / \text{min} \times \text{Volume}_{\text{total}}) / (\epsilon \times \text{Volume}_{\text{Probe}} \times d)$$

3.5.7 Caspase-3-Aktivitätsbestimmung

Da während des programmierten Zelltods vermehrt intrazelluläre Caspasen exprimiert sowie aktiviert werden, sind sie ein guter Marker für die Apoptose. Caspase-3 spielt eine zentrale Rolle im Hinblick auf extrinsische Apoptose-Signale, weswegen sie in unseren Versuchen nachgewiesen wurde. Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und in 100 µl Caspase-Lysepuffer aufgenommen. Nach

10 minütiger Zentrifugation (12000 x g, 4°C) wurden 60 µl Überstand mit 60 µl Caspase-Reaktionspuffer und 42 µmol/l DEVD (Asp-Glu-Val-Asp)-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (DEVD-AFC) (Endkonzentration) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Fluoreszenz des Spaltprodukts AFC wurde nach 30 und 60 min gemessen. Dabei erfolgte die Detektion bei 400 nm Anregungs- und 505 nm Emissionswellenlänge im Multiwell-Reader (Infinite, Tecan, Deutschland). Die Quantifizierung des gespaltenen AFC erfolgte durch eine AFC-Kalibrierungskurve (Konzentrationen: 1 – 8 µM) und in Bezug auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe.

3.6 Mikroskopie

Jegliche in dieser Arbeit aufgeführten Mikroskop-Aufnahmen wurden am Keyence BZ-8100E generiert.

3.6.1 Migrationsanalyse mittels Wundheilungs-Assays

Mit Hilfe des Wundheilungs- oder auch *scratch*-Assays wird die Fähigkeit von Zellen untersucht, einen Zell-freien Raum zu füllen. Dazu werden Zellen in kleine Gummimanschetten, welche aus zwei Kammern bestehen, eingesät. Wird die Manschette entfernt, müssen die in den Kammern angesäten Zellen den Zell-freien Spalt überwinden. Um physiologische Bedingungen so nah wie möglich nachzustellen, wurde dieser Versuch in Serum-haltigem Medium durchgeführt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit scramble-miR, miR-29b-Mimic oder miR-29b-LNA-Inhibitor in Medium ohne Serum transfiziert. Nach 8 h erfolgte ein Wechsel auf Serum-haltiges Medium. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit EDTA-Lösung gewaschen, trypsinisiert und in Medium mit Serum aufgenommen. Es folgte eine Zellzählung im CASY-Zellzähler (Innovatis AG, Reutlingen). Zwei mal 30000 Zellen wurden in Gummimanschetten auf Mikroskopieschalen (beides von IBIDI, Martinsried) angesät. Nach 24 h hatten sich die Zellen abgesetzt und die Manschette wurde entfernt. Zu jeder Probe wurden 2 mL frisches Serum-haltiges Medium gegeben und die Analyse gestartet. Es wurde nach 0 h, 6 h, 24 h und 48 h eine Mikroskopaufnahme erstellt. Für

die Auswertung wurde die Zell-freie Fläche mittels des Keyence BioZero Analyzers bestimmt.

3.6.2 Migrationsanalyse mittels Time Lapse-Analyse

Bei der Migrationsanalyse via Time Lapse wurden lentiviral transfizierte HAoSMC Zellen auf Petrischalen mit Glasboden (IBIDI, Martinsried) angesät und zum Anhaften für 24 h im Brutschrank inkubiert. Bei Stimulationsexperimenten wurde dem Medium während dieser Zeit bereits DMSO (1:1000) beziehungsweise Aldosteron (10 nM) zugefügt. Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel auf HEPES-Ringer (ohne Bicarbonat, 11 mM Glucose, 10 % FCS, pH 7.4). Für die Stimulationsexperimente wurde hier ebenfalls DMSO bzw. Aldosteron zugegeben. Die Migrationsanalyse erfolgte in einer speziellen Mikroskop-Inkubationskammer, bei 37°C und maximaler Luftfeuchte. Über einen Zeitraum von 4 h wurde nach jeweils 5 Minuten eine Mikroskop-Aufnahme erstellt. Anschließend wurde die von den Zellen zurückgelegte Distanz mit Hilfe der ImageJ Software einzeln analysiert und ausgewertet.

3.7 Puffer und Lösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Lösungen und Puffer verwendet:

Tabelle 3-14: verwendete Puffer und Lösungen

Puffer oder Lösung	Inhaltsstoffe
EDTA-Lösung	137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 6,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat; 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 0,6 mM EDTA; pH 7,1-7,3
Trypsin-Lösung	137 mM Natriumchlorid; 2,7 mM Kaliumchlorid; 6,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat; 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 0,54 mM EDTA; 0,1% Trypsin; pH 7,1 -7,3
10x PBS	137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 1,5mM Kaliumhydrogenphosphat
PBS-Tween	1 x PBS, 0,05 % (v/v) Tween20

10x TBS	170 nM Tris-HCl; 30 mM TRIS; 1,4 M Natriumchlorid; pH 7,6
TBS-Tween	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20
Laufpuffer	25 mM TRIS, 3,47 mM Natriumdodecylsulfat, 0,19 M Glycin
Transferpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Laemmli-Puffer	0,5 mM Tris-HCl, pH 6; 4% SDS; 10% 2-Mercaptoethanol; 20 % Glycerol; 0,01 % Bromphenolblau
Pellet-Puffer	1mM EDTA, 1 mM Natrium-Orthovanadat, Proteasehemmer-Cocktail (1:500), pH 7,4
RIPA-Lysepuffer	150 mM Natriumchlorid, 10 mM TRIS, pH 7,4, 1 % Nonidet P-40, 0,1 % SDS, 1 % Natriumdeoxycholat, 0,1 % Triton X-100, Proteasehemmer-Cocktail (1:500), 1 mM EDTA, 1 mM Natrium-Orthovanadat, 1 mM Natriumfluorid
Vollers-Puffer	150 mM Natriumcarbonat, 0,35 M Natriumhydrogencarbonat
HEPES-Ringer	122,5 mM Natriumchlorid, 5,4 mM Kaliumchlorid, 0,8 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 1,2 mM Calciumchlorid-Dihydrat, 1 mM Natriumhydrogenphosphathydrat, 5,5 mM Glucose * H ₂ O, 10 mM HEPES, pH 7,4
Caspase-Lysepuffer	10 mmol/l TRIS, 100 mmol/l Natriumchlorid, 1 mmol/l EDTA, 0,01 % Triton X-100, pH 7,5
Caspase-Reaktionspuffer	20 mmol/l piperazine-1,4-bis-2-ethanesulfonic acid (PIPES), 4 mmol/l EDTA, 0,2 % 3- ([3-cholamidopropyl) - dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid (CHAPS), 10 mmol/l Dithiothreitol (DTT), pH 7,4
HRP-Substrat-Puffer	4,6 mM o-Phenylenediamine, 75 mM Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 38 mM Zitronensäure, 0,015 % Wasserstoffperoxid

3.8 Verwendete Software und Datenbanken

Zur Auswertung und Analyse der erarbeiteten Daten wurden folgende Programme verwendet:

- Microsoft Excel
- GraphPad Prism 5
- SigmaPlot 12
- ImageJ
- Keyence BioZero Viewer und Analyzer
- Quantity One

Des Weiteren wurden zur Recherche nachfolgende Internet-Datenbanken genutzt:

- TargetScan
- PubMed
- miRbase
- NCBI
- RNA-Hybrid (www.bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.htm)

3.9 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. „N“ bezeichnet dabei die Anzahl der verwendeten Zellpassagen bzw. Individuen, während „n“ die Menge der Einzelversuche widerspiegelt. Durch Anwendung nicht-parametrischer Tests (Student T-Test sowie Mann-Whitney-Test) wurden ungepaarte Werte-Gruppen statistisch verglichen. Statistische Signifikanz wurde erreicht wenn $p < 0,05$ war. Die Signifikanz der Daten wurde in dieser Arbeit wie folgt gekennzeichnet:

* $p < 0,05$

** $p < 0,005$

*** $p < 0,001$

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 MiR-29b – eine Aldosteron-abhängige miR

4.1.1 Nachweis des MR in vaskulären Zellen

Zu Beginn wurde der Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) in verschiedenen Zelltypen der humanen Aorta nachgewiesen. Die beiden wichtigsten Vertreter darunter sind die glatten Gefäßmuskelzellen, da sie den Hauptanteil der Gefäßwand bilden sowie die Endothelzellen, da sie eine wichtige Barrierefunktion im Lumen der Gefäße erfüllen. Der Nachweis des MR in diesen Zellen war von grundlegender Bedeutung, da Aldosteron den endogenen MR aktivieren und über ihn wirken kann.

Wie in Abbildung 4-1 gezeigt ist, wurde der MR konstitutiv über mehrere Passagen in primären HAoSMCs, wie auch in HAoECs exprimiert.

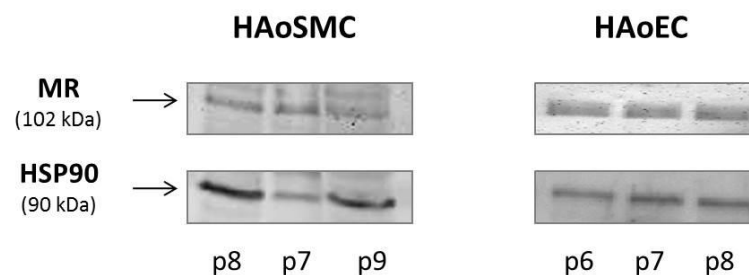


Abbildung 4-1: MR-Nachweis in primären humanen Gefäßzellen mittels Western Blot. In primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HAoSMC) sowie Endothelzellen (HAoEC) wurde der MR auf Proteinebene spezifisch nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass in beiden Zelltypen endogener MR über mehrere Passagen vorhanden war. HSP90 diente als Ladekontrolle.

4.1.2 Aldosteron senkt miR-29b zelltypspezifisch

4.1.2.1 Nachweis über die miR-Transkriptmenge

Um miRs zu identifizieren, welche potenziell Aldosteron-reguliert sind, wurden MicroArrays von Miltenyi durchgeführt. Diese Arrays wurden von den Medizindoktoranden Daniel Müller sowie Franziska Neid in Triplets erstellt und sind Teil deren Dissertationen.

MiR-Kandidaten, welche potenziell abhängig von Aldosteron waren, wurden anschließend mit Hilfe von TaqMan qPCR validiert. Diese Methode dient unter anderem dem spezifischen Nachweis kleiner RNA-Moleküle und verspricht eine hohe Genauigkeit und Sensitivität.

Unter den untersuchten miRs war miR-29b am stärksten reguliert. In den HA-VSMCs wurde die miR-29b-Menge durch Aldosteron um das 2,86-fache ($\Delta\Delta Cq = -1,52$; SEM $\pm 0,37$) verringert. Der gleiche Effekt wurde auch in primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HAoSMC) detektiert, in welchen der miR-29b-Gehalt um das 1,54-fache ($\Delta\Delta Cq = -0,57$; SEM $\pm 0,16$) Aldosteron-abhängig abnahm (Abb. 4-2 A).

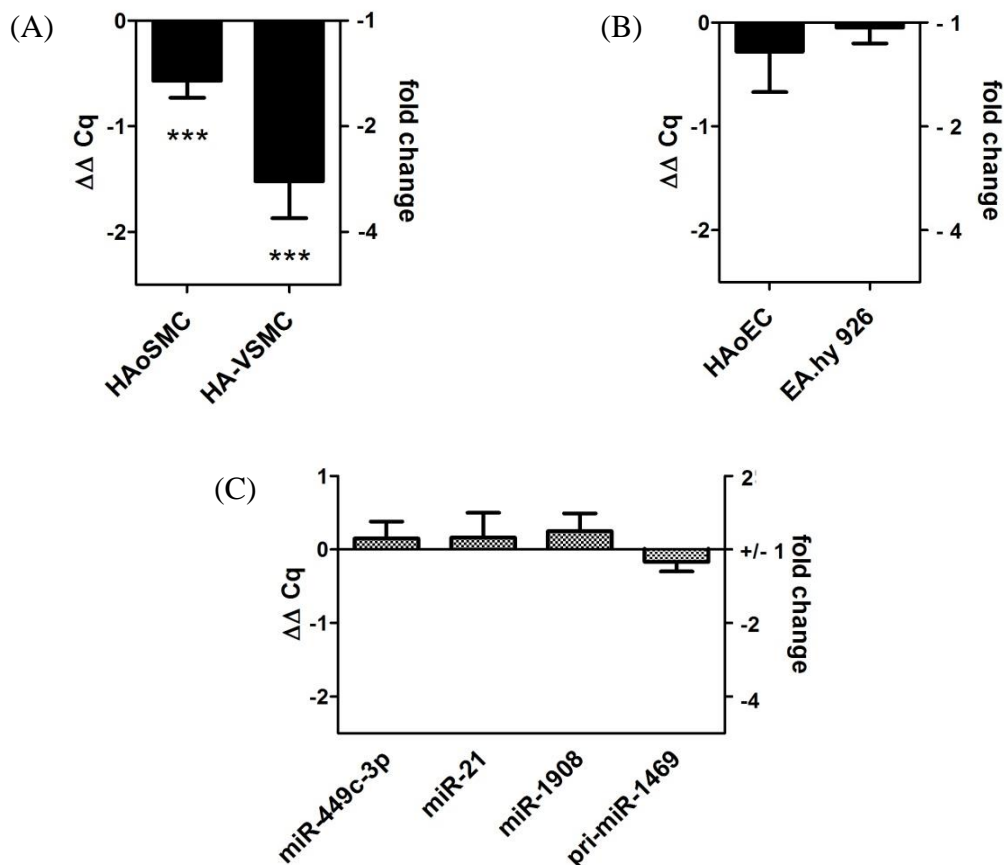


Abbildung 4-2: Aldosteron senkt die miR-29b-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen (publiziert in ²⁹³). In den primären (HAoSMC) sowie in der Zelllinie humaner glatter aortaler Gefäßmuskelzellen (HA-VSMC) wurde die miR-29b-Menge durch 10 nM Aldosteron signifikant reduziert (A). In primären Endothelzellen (HAoEC) sowie der Endothelzelllinien (EA.hy 926) zeigte Aldosteron keinen Effekt auf die miR-29b-Konzentration (B). Weitere, durch die microArrays bestimmte, potenziell MR-abhängige miRs, konnten durch qPCR nicht bestätigt werden und wurden nicht Aldosteron-abhängig reguliert (C). N = 3-20 ; n = 10-29

Um zu überprüfen, ob miR-29b zellspezifisch reguliert wird, erfolgte zusätzlich ein Nachweis in Endothelzellen. Weder in den primären humanen Endothelzellen (HAoEC)

noch in der Endothelzelllinie EA.hy 926 konnte eine Regulation der miR-29b durch Aldosteron detektiert werden (Abb. 4-2 B). Andere durch den MircoArray vorausgesagte miRs konnten durch die TaqMan qPCR nicht bestätigt werden. Wie in Abbildung 4-2 C zu sehen ist, waren weder miR-449c-3p, noch miR-21, miR1908 oder miR-1469 Aldosteron-abhängig.

4.1.2.2 Nachweis über Reporter-Gene

Weiterhin wurden Reporter-Gen-Analysen durchgeführt um die regulatorische Wirkung von Aldosteron auf miR-29b weiterführend zu analysieren. Dabei wurden die zu untersuchenden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches eine miR-29b-Bindestelle *downstream* vom Luciferasegen enthält. Misst man nach Zellstimulation eine erhöhte Luciferase-Aktivität deutet dies auf eine verminderte miR-29b-Expression hin, ein vermindertes Reportersignal hingegen auf eine erhöhte miR-29b-Konzentration. MiR-29b-Mimic bzw. -Inhibitor wurden als Kontrollen genutzt.

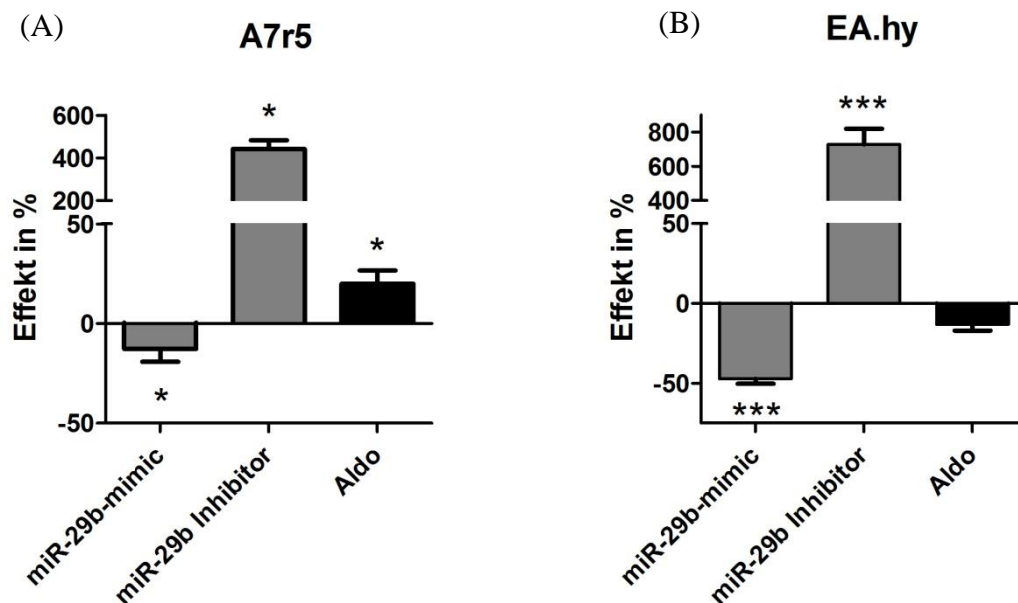


Abbildung 4-3: Reporter-Gen-Assay zur Validierung der miR-29b-Funktion und des Aldosteroneffekts (publiziert in ²⁹³). MiR-29b-Mimic und -Inhibitor wurden als Positiv- und Negativ-Kontrollen verwendet und belegten, dass je weniger miR-29b vorhanden war, das Lumineszenz-Signal stieg. Aldosteron zeigte nur in den glatten Gefäßmuskelzellen A7r5 einen signifikanten Effekt und belegte somit einen Einfluss des Steroidhormons auf die endogene miR-29b-Menge (A). In den Endothelzellen EA.hy zeigte sich kein Aldosteroneinfluss auf den Reporter (B). N = 3; n = 9-15

Eine Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen A7r5 mit Aldosteron ließ die Luciferase-Aktivität um 20,0 % (SEM ± 6,71 %) signifikant ansteigen und deutet auf

eine direkte miR-29b-Regulation durch das Steroidhormon hin. Der Effekt des Inhibitors zeigte ebenfalls einen Anstieg des Signals, sodass Aldosteron einen qualitativ vergleichbaren Einfluss wie der miR-29b-Inhibitor hatte. Dessen Signal stieg auf 441,6 % (SEM \pm 41,5 %) an. Ein Überschuss von miR-29b führte zu einem um 12,8 % (SEM \pm 6,4 %) verringerten Lumineszenz-Signal (Abb. 4-3 A).

Im direkten Vergleich dazu führte eine Aldosteronstimulation in den Endothelzellen EA.hy 926 zu keinem signifikant veränderten Reporter-Signal (Abb. 4-3 B). Die Kontrolleffekte waren qualitativ mit denen in den glatten Gefäßmuskelzellen vergleichbar. In den EA.hy 926 Zellen verringerte miR-29b-Mimic das Reporter-Signal um 47,3 % (SEM \pm 3,0 %), wohingegen der miR-29b-Inhibitor die Lumineszenz um 728 % (SEM \pm 90,9 %) verstärkte.

4.1.3 Regulation der miR-29-Familie durch Aldosteron bzw. Endothelin-1 im Vergleich

Da miR-29b mit den beiden weiteren miR-29-Familienmitgliedern in zwei primären Transkripten co-transkribiert wird, wurde ebenfalls die Aldosteronabhängigkeiten von miR-29a und miR-29c untersucht. Zusätzlich sollte geklärt werden, ob weitere vasoaktive Substanzen, wie z.B. Endothelin-1, neben dem RAAS, ebenfalls die miR-29-Familie beeinflussen.

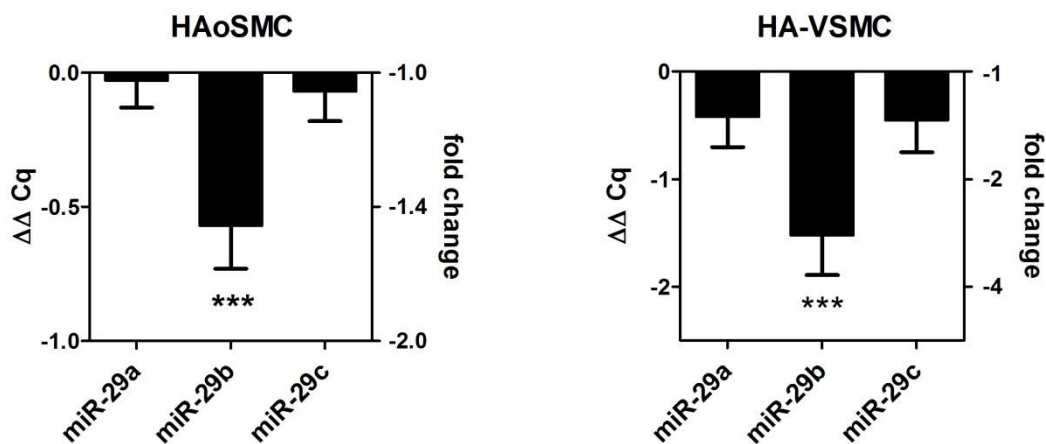


Abbildung 4-4: Aldosteron reduziert miR-29b als einziges Mitglied der miR-29-Familie. Sowohl in den HAoSMCs als auch in den HA-VSMCs zeigte sich miR-29b als einzige Aldosteron-regulierte miR. Die Expressionänderungen von miR-29a und miR-29c zeigten hingegen keinen signifikanten Effekt. N = 6-20; n = 10-29

Sowohl in den primären Gefäßmuskelzellen (HAoSMC), als auch in der Gefäßmuskelzelllinie (HA-VSMC) war von der miR-29-Familie ausschließlich miR-29b signifikant Aldosteron-abhängig. Weder miR-29a noch miR-29c zeigten eine spezifische Antwort auf das Steroidhormon (Abb. 4-4). In den primären Zellen wurde weder der Gehalt von miR-29a noch miR-29c signifikant durch Aldosteron verändert, was die Alleinstellung der miR-29b aufzeigt. In den HA-VSMC wurden vergleichbare Transkriptmengen an miR-29a und miR-29c ermittelt. Wie bereits in Abbildung 4-2 (A) gezeigt wurde, war einzig miR-29b in HAoSMCs und HA-VSMCs signifikant durch Aldosteron reduziert.

Neben Aldosteron, Mitglied des RAAS, wurde der Einfluss von Endothelin-1, eines ebenfalls vasoaktiven Botenstoffs, untersucht. Für diesen Versuch wurden HA-VSMCs eingesetzt, da hier der Aldosteroneffekt am stabilsten nachgewiesen wurde. Es zeigte sich, dass alle Mitglieder der miR-29-Familie durch Endothelin-1 unbeeinflusst waren (Abb. 4-5).

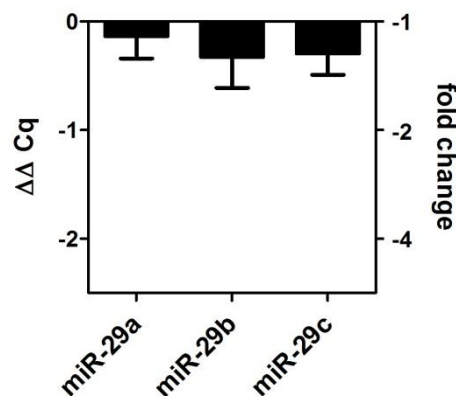


Abbildung 4-5: Endothelin-1 zeigt keinen Effekt auf die miR-29-Familie in HA-VSMC (publiziert in ²⁹³). Eine Endothelin-1-Stimulation (100 nM) in HA-VSMCs zeigte keinen Einfluss auf die Mitglieder der miR-29-Familie. N=4; n=15

4.1.4 Aldosteron beeinflusst die Expression von Mitgliedern der miR-29-Familie in der Mauseorta *in vivo*

Um die VSMC-spezifischen Daten auch *in vivo* zu validieren, wurde in C57BL6 Mäusen die Plasmakonzentration an Aldosteron, durch chronische Aldosteronapplikation, signifikant erhöht. Nach 14 Tagen wurde die Aorta isoliert und RNA extrahiert um potenzielle Veränderungen der miR-29-Familie, im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Aldosteronbehandlung, zu untersuchen.

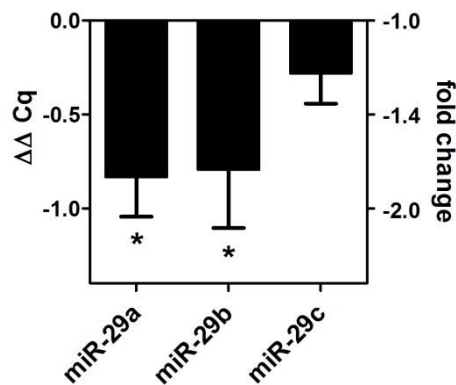


Abbildung 4-6: Aldosteron beeinflusst Mitglieder der miR-29-Familie *in vivo*. In Mäusen mit erhöhtem Aldosteronplasmaspiegel waren miR-29a und miR-29b signifikant reduziert. MiR-29c blieb als einziges Mitglied der miR-29-Familie unbeeinflusst von Aldosteron. N = 8; n = 8

Aldosteron verringerte die miR-29a wie auch die miR-29b signifikant um das 1,78-fache ($\Delta\Delta Cq = -0,86$; SEM $\pm 0,21$) bzw. das 1,74-fache ($\Delta\Delta Cq = -0,80$; SEM $\pm 0,31$) (Abb. 4-6). MiR-29c wurde in der Mausaorta durch Aldosteron nicht reguliert.

4.1.5 Aldosteron wirkt über den MR auf miR-29b

Um zu testen, ob der gemessene Aldosteroneffekt über den MR vermittelt wird, wurden Versuche durchgeführt, in denen ein Aldosteronantagonist, Eplerenon, in HA-VSMCs eingesetzt wurde. Die kompetitive Hemmung erzielt Eplerenon, indem es spezifisch und mit hoher Affinität an den MR bindet und dadurch eine Aktivierung durch Aldosteron verhindert.

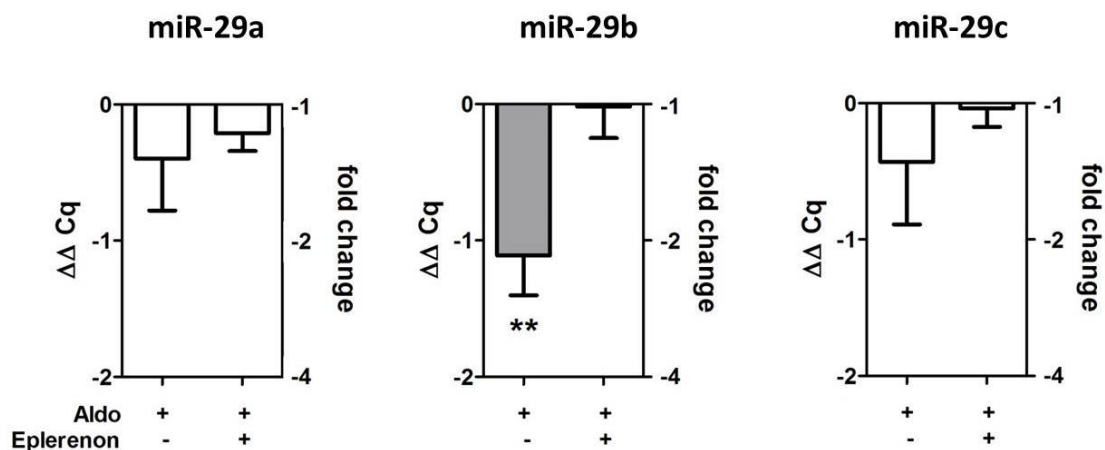


Abbildung 4-7: Eplerenon hemmt den Aldosteroneffekt bezüglich miR-29b in HA-VSMCs (publiziert in ²⁹³). Hinsichtlich der miR-29a und miR-29c wurde gemessen, dass weder Aldosteron allein, noch in Kombination mit Eplerenon (5 μM) einen Effekt bewirkte. Einzig miR-29b zeigte eine signifikante Reduktion durch Aldosteron. Eplerenon hob diesen Effekt auf. N=3; n=6

Die Blockierung des MR erfolgte zirka 4 h vor Aldosteronstimulation und ergab, dass der Gehalt an miR-29a und miR-29c weder durch Aldosteron alleine, noch durch Hemmung des MR mittels Eplerenon, verändert wurden (Abb. 4-7, links und rechts). Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, reduzierte Aldosteron einzig die Menge an miR-29b. In diesem Versuch wurde eine signifikante Verringerung um das 2,15-fache ($\Delta\Delta Cq = -1,11$; SEM $\pm 0,29$) erreicht. Dieser Effekt konnte durch Eplerenon verhindert werden (Abb. 4-7, Mitte).

4.1.6 Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in heutiger Zeit die Haupttodesursache in den Industrienationen ¹. Wie verschiedene Studien zeigen, sind das Steroidhormon Aldosteron und sein klassischer Rezeptor, der MR, bekannt dafür, die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu begünstigen. In den Studien EPHEBUS und RALES konnten die Sterberate von Patienten mit Herzversagen signifikant durch Gabe von MR-Antagonisten reduziert werden ^{97,98}. Weitere *in vivo* Studien zeigten, dass ein Aldosteronüberschuss in Rattenherzen zu Remodeling und diastolischer Dysfunktion führt. Durch Blockierung des MR mittels Spironolakton konnten diese Effekte verhindert werden ¹¹⁸. Spironolakton verminderte in Mausvenen ebenfalls eine Aldosteron-bedingte Gefäßverdickung und Entzündung ¹¹⁹. Obwohl man Aldosteron und den MR als Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen benennen kann, ist ihr genauer pathologischer Wirkmechanismus weitgehend ungeklärt.

Als mögliche Schlüssel-moleküle liegt unser Fokus auf miRs, deren Rolle in Herz-Kreislauf-Erkrankungen zunehmend an Bedeutung gewinnt. MiRs sind kleine regulatorische RNA-Moleküle, deren veränderte Expressionsprofile in diversen vaskulären Fehlfunktionen nachgewiesen wurden, wie miR-21 in Erkrankungen der Herz-Kranzgefäße, miR-221/-222 nach vaskulärer Verletzung durch Angioplastie oder miR-29b in der Entstehung von Aortenaneurysmen ^{231,281,294}. Der Zusammenhang zwischen Aldosteron/MR und miRs ist hingegen weniger gut erforscht. Die meisten dazu vorliegenden Erkenntnisse beziehen sich auf miRs, die den MR regulieren, wie miR-124 und miR-135a in der MR-Expression sowie miR-21 und miR-24 in der Produktion und Sekretion von Aldosteron. Ebenso wurden Mutationen im 3'UTR von

RAAS-Genen identifiziert, welche potenziell den arteriellen Blutdruck oder das Risiko eines Myokard-Infarkts steigern^{244–247}. Bekannte miRs, die durch den MR reguliert werden, sind z.B. miR-335-3p, miR-290-5p und miR-1983, welche den Natrium-Transport in der Mausniere beeinflussen²⁴⁹. In Podozyten erhöht der MR miR-124, miR-190, miR-188 und miR-217²⁵⁰.

Identifizierung von miR-29b als Aldosteron-sensitive miR in VSMCs

Bekannte endogene Stimuli, welche vaskuläres Remodeling begünstigen können, sind neben Aldosteron auch Angiotensin II oder Endothelin-1. Angiotensin II fördert Remodeling-Prozesse im Herzen indem es miR-29b reduziert und parallel den Sp1-TGF β /Smad-NF- κ B Signalweg aktiviert²⁹⁵. Aldosteron verringert miR-208a im Herzen mit einhergehender Herzhypertrophie²⁴⁸. In unseren Versuchen charakterisierten wir zunächst die Effekte von Aldosteron, dem zweiten Effektormolekül des RAAS, welches, wie auch sein klassischer Rezeptor, der MR, bekannt ist kardiovaskuläre Erkrankungen zu begünstigen. In den untersuchten Gefäßzellen konnten wir eine stabile MR-Protein-expression nachweisen, was Grundlage für die Aldosteronwirkung war. Weiterhin identifizierten wir miR-29b als ein Aldosteron-sensitives RNA-Molekül in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Die Hormon-spezifische Reduktion der miR-29b-Konzentration war nicht nur in humanen primären sowie immortalisierten Gefäßmuskelzellen nachzuweisen, sondern auch in der Mauseorta *in vivo*, was die physiologische Bedeutung des Effekts untermauert. Experimente mit Reporter-Genen belegten die Aldosteron- und VSMC-spezifische Verringerung der miR-29b-Menge. In primären sowie immortalisierten humanen Endothelzellen konnte durch qPCR und Reporter-Gen-Analyse keine miR-29b-Regulation nachgewiesen werden, was die Zellspezifität für VSMCs hervorhebt. Für Endothelin-1, als Vertreter vasoaktiver Moleküle außerhalb des RAAS, zeigte sich, dass die Transkriptmenge von miR-29b unverändert blieb. Somit kann eine allgemeine Regulation der miR-29b durch vasoaktive Substanzen ausgeschlossen werden.

Passend zu den bekannten pathologischen MR-Wirkungen wurde eine verringerte miR-29b-Expression ebenfalls in Patienten mit Herzversagen im Endstadium festgestellt, ein Krankheitsbild, welches oft im Zusammenhang mit einem überaktivem RAAS steht und auf eine Therapie mit MR-Antagonisten anspricht²⁵⁷. In Patienten mit Vorhofflimmern, einer anderen Bedingung, für welche erhöhte Aldosteronkonzentrationen einen

Risikofaktor darstellen, war miR-29b ebenfalls reduziert²⁵⁸. Zusätzlich wurde in Ratten mit verminderter 11 β -HSD2-Aktivität ein reduzierter miR-29b-Gehalt in der Niere nachgewiesen²⁵⁹. Dabei ist zu erwarten, dass der miR-Effekt mit einer inadäquaten MR-Aktivierung durch Kortisol einhergeht. Die von uns identifizierte MR-abhängige miR-29b erweitert die Bedeutung von miRs in Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

MiR-29a und miR-29c sind in VSMCs Aldosteron-unabhängig

Mitglieder der miR-29-Familie werden in zwei bicistronischen Clustern transkribiert, miR-29a/b-1 und miR-29b-2/c, welche auf Chromosomen 7 und Chromosom 1 lokalisiert sind. MiR-29b-1 und miR-29b-2 besitzen eine identische Sequenz während miR-29a und miR-29c sich in einem Nukleotid unterscheiden²⁹⁶. Im Menschen wie auch in der Maus ist die miR-29-Familie ubiquitär exprimiert, obgleich das Verhältnis der einzelnen miRs untereinander gewebspezifisch variiert, wie Versuche in der Niere Salz-sensitiver Ratten zeigten²⁵⁵. In unseren Versuchen zeichnete sich bezüglich der Regulation eine gewisse Alleinstellung der miR-29b ab, da miR-29a und miR-29c in den VSMCs durch Aldosteron nicht reguliert wurden. Weiterhin blieben die Konzentrationen an miR-29a und -c auch von Endothelin-1 unbeeinflusst, was die Vermutung zulässt, dass diese miRs in VSMCs unabhängig von vasoaktiven Substanzen sein könnten. Mögliche Erklärungsansätze, für die unterschiedliche Expressionsregulation von Mitgliedern der gleichen miR-Familie, sind alternatives *Splicing* des primären Transkripts oder verschiedene Stabilitäten der einzelnen miRs. In HeLa Zellen bzw. in der Niere ist miR-29a die am häufigsten vorkommende miR aus der miR-29-Familie. Während des Zellzyklus konnte miR-29a durchgehend nachgewiesen werden, während miR-29b nur in der Mitose-Phase und miR-29c nie detektierbar war²¹⁰. Diese Forschungsergebnisse belegen die diverse Regulation von miRs einer Familie. Hinsichtlich der Mausearten konnten die Daten aus VSMCs für miR-29b und miR-29c bestätigt werden. MiR-29a hingegen ist *in vivo* durch einen erhöhten Aldosteronspiegel reduziert, was durch physiologische Einflüsse oder die Zellkomposition der Aorta erklärt werden könnte.

Aldosteron wirkt über den endogenen MR auf miR-29b

Durch Blockierung des MR mittels Eplerenon konnten wir belegen, dass die Aldosteron-bedingte miR-29b-Reduktion nur durch einen aktivierbaren MR vermittelt werden kann.

Aldosteron wirkt demnach über seinen klassischen Rezeptor, den MR, und miR-29b stellt ein Effektormolekül des MR dar (Abb. 4-8).

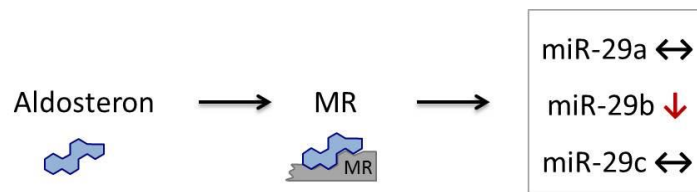


Abbildung 4-8: Aldosteron wirkt über den MR auf miR-29b.

Wie klinische Studien belegen ist ein aktiver MR ein Hauptrisikofaktor im kardio-vaskulären Remodeling und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wobei er Gefäßentzündung, Fibrose, Hypertrophie und eine resultierende Schädigung von Endorganen fördert⁹⁶⁻⁹⁸. Klassischerweise wirkt der MR als Transkriptionsfaktor mit Aldosteron als endogenem Ligand im Menschen. Seine Pathophysiologie kann jedoch nicht allein über die genomische Wirkung erklärt werden, sondern involviert zusätzliche nicht-genomische Mechanismen.

Quantität des detektierten miR-Effekts

Die von uns detektierte miR-Regulation im 2-fach-Bereich ist zwar gering, jedoch durchaus realistisch, wie miR-Konzentrationen im Aldosteron- und Renin-stimulierten Herzen bzw. in Patienten im zeitigen Stadium von Herzversagen bestätigen^{248,297}. So werden durch Hormon-Stimulation weit schwächere Effekte erwartet als z.B. bei der Analyse maligne transformierten Gewebes. Die Häufigkeit einer miR spielt dabei zusätzlich eine wichtige Rolle, da bereits die 2-fache Regulation einer hoch exprimierten miR akute Effekte auf die Zellhomöostase auslösen kann. Weiterhin gilt es zu berücksichtigen, dass jedes Gewebe ein einzigartiges miR-Expressionsmuster aufweist, was Vergleiche erschwert.

4.2 Untersuchungen zum Mechanismus der miR-29b-Reduktion

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde reduziert Aldosteron miR-29b MR-abhängig und VSMC-spezifisch, ohne weitere miR-29-Familienmitglieder zu beeinflussen. Um die mechanistischen Besonderheiten dieses Effekts näher zu untersuchen,

wurde der Einfluss von Aldosteron auf die miR-Prozessierung sowie die subzelluläre Lokalisation untersucht.

4.2.1 Aldosteron hat keinen Einfluss auf das primäre Transkript

Um einzugrenzen auf welcher Ebene die miR-29b MR-abhängig reguliert wird, wurde die Expression der primären Transkripte untersucht. Diese sogenannten pri-miRs sind nukleär lokalisiert und Grundlage der miRNA-Reifung (Abb. 4-9).



Abbildung 4-9: Schema der miR-Reifung. Der Fokus lag hier auf dem primären Transkript (pri-miR).

Für die miR-29b sind zwei primäre Transkripte bekannt, pri-miR-29b-1 und pri-miR-29b-2 (Abb. 4-10 A). Untersuchungen der Transkriptmenge beider pri-miRs zeigten in den primären Gefäßmuskelzellen (HAoSMCs) keine signifikante Änderung nach Aldosteronstimulation (Abb. 4-10 B).

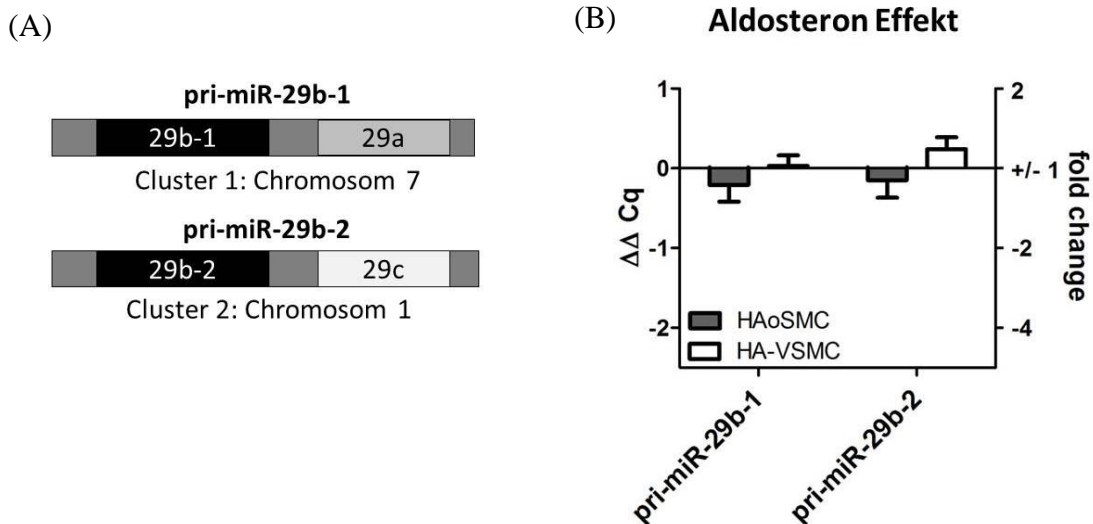


Abbildung 4-10: Pri-miR-Nachweis nach Aldosteroninkubation (publiziert in ²⁹³). Die miR-29b kann von zwei Transkripten stammen und wird entweder mit der miR-29a bzw. mit der miR-29c co-transkribiert (A). Aldosteron (10 nM) zeigte weder in HAoSMCs noch in HA-VSMCs einen Effekt auf die Primärtranskripte (B). N = 3-21; n = 15-31

Vergleichbare Ergebnisse lieferten Versuche in den HA-VSMCs. Aldosteron bewirkte auch hier keine veränderte Expression von pri-miR-29b-1 bzw. pri-miR-29b-2 (Abb. 4-10 B).

Um den genauen Mechanismus der MR-Regulation näher zu untersuchen, wurden Versuche mit Actinomycin D durchgeführt, einem spezifischen DNA-Interkalator, welcher die RNA-Neusynthese blockiert.

Dafür wurden HA-VSMC Zellen für 1 h mit Actinomycin D vorinkubiert und anschließend mit Aldosteron für 24 h stimuliert (Abb. 4-11 A). Die Ergebnisse zeigten, dass Aldosteron keinen Einfluss auf die Expression der pri-miRs unabhängig von der Actinomycin D-Behandlung hatte (Abb. 4-11 B). Nach Actinomycin D und Aldosteroninkubation waren beide pri-miRs nicht signifikant reguliert.

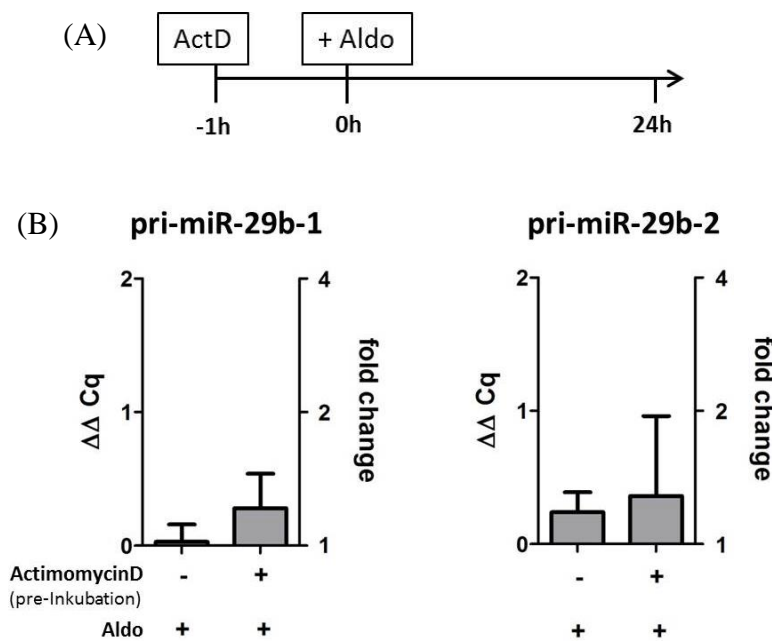


Abbildung 4-11: Pri-miR-Expression nach Actinomycin D-Vorinkubation und Aldosteronstimulation. HA-VSMCs wurden für 1 h mit 5 mg / l Actinomycin D vorinkubiert und anschließend für 24 h mit Aldosteron stimuliert (A). Weder die Menge an pri-miR-29b-1 noch an pri-miR-29b-2 zeigten eine signifikante Veränderung nach Aldosteroninkubation, noch nach der Vorbehandlung mit Actinomycin D (B). N = 3; n = 4

Des Weiteren wurden Experimente durchgeführt, bei welchen HA-VSMCs für 20 h mit Aldosteron stimuliert wurden, bevor die RNA-Synthese mittels Actinomycin D blockiert wurde (Abb. 4-12 A). Anschließend wurde nach 0 h, 1 h, 3 h, und 6 h RNA isoliert und die pri-miRs vermessen. Binnen 6 h sank die pri-miR-29b-1-Menge signifikant auf das 4,95-fache ($\Delta Cq = -2,31$; SEM $\pm 0,18$) unter Kontrollbedingungen

und auf das 5,25-fache ($\Delta Cq = -2,39$; SEM $\pm 0,09$) nach Aldosteronstimulation. Der direkte Vergleich jedoch zwischen Zellen die mit DMSO bzw. Aldosteron inkubiert wurden, zeigte keinen Unterschied dieser Gruppen zueinander (Abb. 4-12 B, links).

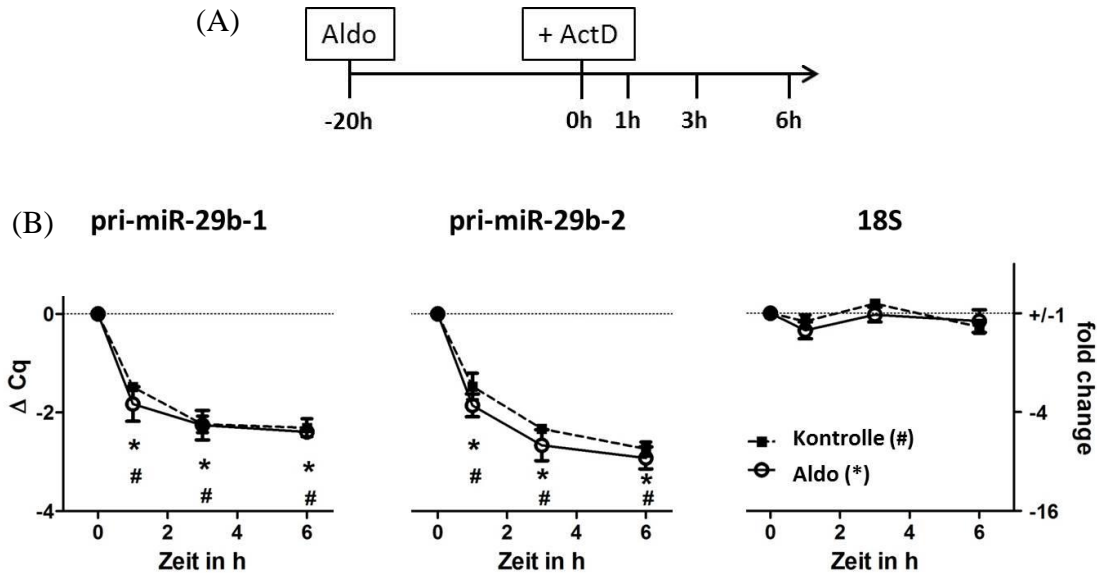


Abbildung 4-12: Pri-miR-Gehalt im Actinomycin D-Zeitverlauf (publiziert in ²⁹³). HA-VSMCs wurden zuerst für 20 h mit 10 nM Aldosteron und anschließend mit Actinomycin D (5 mg / l) für 1 h, 3 h und 6 h inkubiert (A). Für beide pri-miRs war ein signifikanter Abbau messbar, welcher jedoch unabhängig von der Stimulation war (B). Die 18S rRNA wurde als interne Kontrolle verwendet, da sie weder von der Stimulation noch von Actinomycin D affiziert wurde und über den Zeitverlauf konstant blieb (B). N = 3, n = 4-5

Pri-miR-29b-2 zeigte einen vergleichbaren Kurvenverlauf wie pri-miR-29b-1. Nach 6 h Actinomycin D-Gabe sank ihre Konzentration um das 6,67-fache ($\Delta Cq = -2,74$; SEM $\pm 0,14$) in der Kontrolle und um das 7,58-fache ($\Delta Cq = -2,92$; SEM $\pm 0,22$) in der Aldosterongruppe. Wie pri-miR-29b-1 zeigte auch -29b-2 keinen Unterschied in der Abbaurrate zwischen Kontrollzellen und solchen, die durch Aldosteron stimuliert wurden (Abb. 4-12 B, Mitte). Als interne Kontrolle wurde die 18S rRNA bestimmt, welche weder von Aldosteron noch von Actinomycin D beeinflusst wurde und während des Zeitverlaufs stabil blieb (Abb. 4-12 B, rechts).

4.2.2 Einfluss von Aldosteron auf die Vorläufer-miRs

Da kein Einfluss von miR-29b auf die primären Transkripte detektiert werden konnte, wurden die pre-miRs untersucht, als nächste potenzielle Regulationsebene von Aldosteron (Abb. 4-13).



Abbildung 4-13: Schema der miR-Reifung. Der Fokus lag hier auf der Vorläufer-miR (pre-miR).

Für die miR-29b gibt es zwei Vorläufer-miRs, pre-miR-29b-1 und pre-miR-29b-2, welche sich nur geringfügig in ihrer Sequenz unterscheiden (Abb. 4-14 A). Durch Aldosteronstimulation der HA-VSMC ließen sich beide pre-miRs signifikant reduzieren. Wie aus Abbildung 4-14 B hervorgeht, wurde pre-miR-29b-1 1,65-fach ($\Delta\Delta Cq = -0,72$; SEM $\pm 0,28$) und pre-miR-29b-2 1,82-fach ($\Delta\Delta Cq = -0,87$; SEM $\pm 0,32$) reduziert.

(A)



(B) Aldosteron Effekt

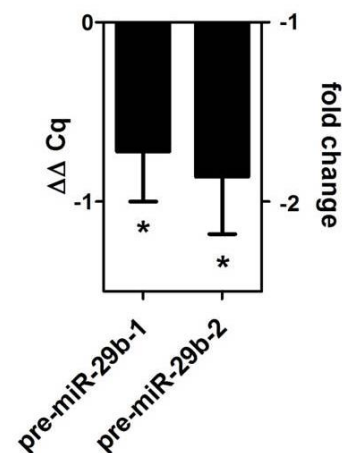
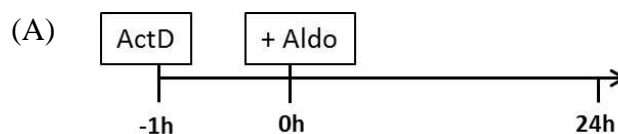


Abbildung 4-14: Pre-miR-29b-Sequenzen und ihre Aldosteronabhängigkeit (publiziert in ²⁹³). MiR-29b (rote Sequenz) kann von zwei pre-miR-Vorläufern generiert werden (A). Nach Stimulation mit 10 nM Aldosteron waren beide pre-miRs signifikant reduziert (B). N = 4, n = 13

Weitere Versuche mit Actinomycin D sollten Aufschluss über die Wirkungsweise des Steroidhormons Aldosteron auf die pre-miRs geben. Eine Vorinkubation mit dem RNA-Synthese-Blocker (Abb. 4-15 A) hob den reduzierenden Aldosteroneffekt, bezüglich der pre-miR-29b-1- und pre-miR-29b-2-Menge, auf (Abb. 4-15 B).



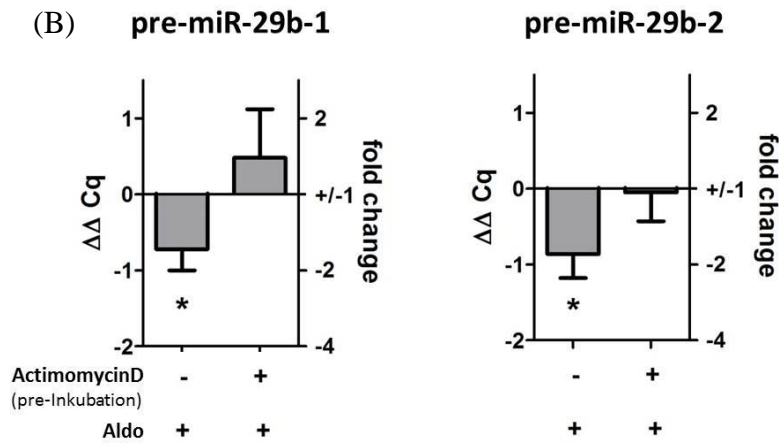


Abbildung 4-15: Pre-miR-29-Gehalt nach Actinomycin D-Vorinkubation (publiziert in ²⁹³). HA-VSMCs wurden für 1 h mit 5 mg / l Actinomycin D vorinkubiert und anschließend für 24 h mit Aldosteron stimuliert (A). Durch die Vorbehandlung mit dem RNA-Synthese Blocker konnte der reduzierende Aldosteroneffekt auf die beiden pre-miRs verhindert werden (B). N = 3, n = 4

Eine Actinomycin D-Gabe nach vorrangegangener Zellstimulation mit Aldosteron (Abb. 4-16 A) zeigte, dass binnen 6 h die Konzentrationen der beiden pre-miRs sowie der internen Kontrolle U6 einem signifikanten Abbau unterlagen (Abb. 4-16 B).

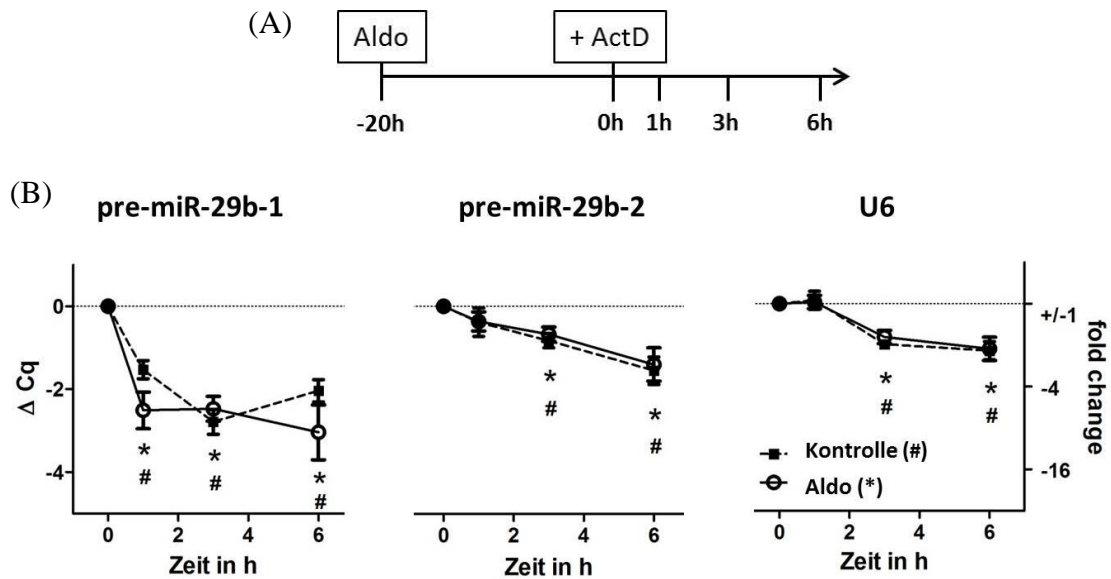


Abbildung 4-16: Pre-miR-Gehalt im Actinomycin D-Zeitverlauf (publiziert in ²⁹³). HA-VSMCs wurden zuerst für 20 h mit 10 nM Aldosteron und anschließend mit Actinomycin D (5 mg / l) für 1 h, 3 h und 6 h inkubiert (A). Für beide pre-miRs war ein signifikanter Abbau messbar, welcher jedoch unabhängig von der Inkubation war (B). Die U6 snRNA wurde als interne Kontrolle mitbestimmt, unterlag jedoch selbst einem zeitlichen Abbau (B). N = 3, n = 4-5

Pre-miR-29b-1 zeigte dabei einen schnelleren Abbau als pre-miR-29b-2. Unter Kontrollbedingungen war der Gehalt an pre-miR-29b-2 nach 6 h um das 2,93-fache ($\Delta Cq = -1,55$; SEM $\pm 0,33$) reduziert, während jener der pre-miR-29b-1 sogar um das

4,12-fache ($\Delta Cq = -2,04$; SEM $\pm 0,27$) verringert war (Abb. 4-16 B, links und Mitte). Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen und jenen, welche durch Aldosteron stimuliert wurden, war jedoch nicht nachweisbar.

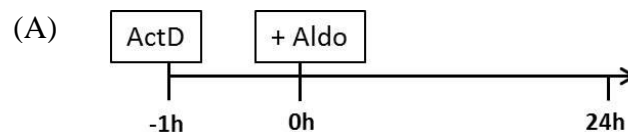
4.2.3 Aldosteron beeinflusst die Stabilität reifer miR-29b

Wie bereits unter 4.1 gezeigt, handelt es sich bei miR-29b um eine miR, die durch Aldosteron reguliert wird. Um näher zu erforschen über welche Wege das Steroidhormon die reife miR-29b und deren Familienmitglieder beeinflusst, wurden, wie bereits bei den pri- und pre-miRs, Actinomycin D-Versuche durchgeführt (Abb. 4-17).



Abbildung 4-17: Schema der miRNA-Reifung. Der Fokus lag hierbei auf der reifen miR.

Als erster Versuchsansatz wurden HA-VSMCs für 1 h mit Actinomycin D inkubiert und anschließend für 24 h mit 10 nM Aldosteron stimuliert (Abb. 4-18 A). Bei der RNA-Analyse wurde nachgewiesen, dass die Mengen an miR-29a wie auch miR-29c nach Actinomycin D-Behandlung nur marginal verändert waren (Abb. 4-18 B, links und rechts). Hinsichtlich der miR-29b konnte durch den RNA-Synthese-Blocker der Aldosteron-abhängige, reduzierende Effekt aufgehoben werden (Abb. 4-18 B, Mitte).



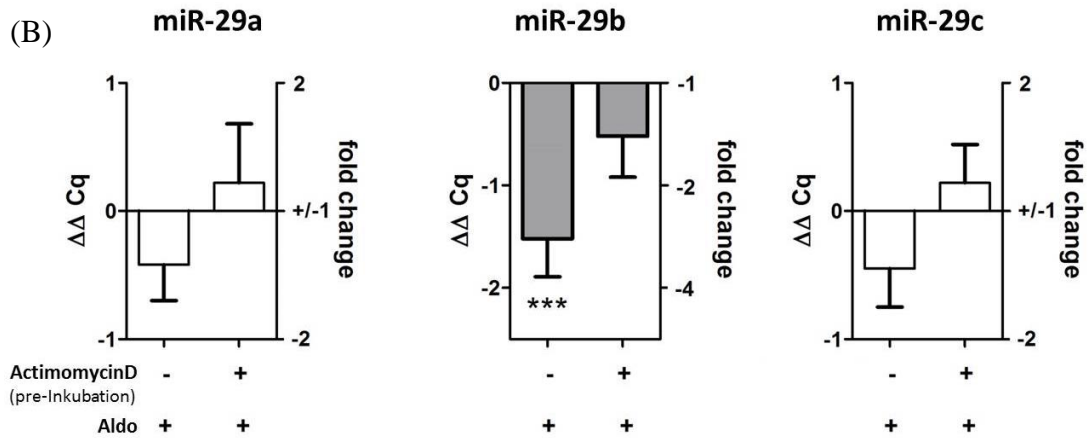


Abbildung 4-18: Gehalt an reifen miRs nach Actinomycin D-Vorinkubation (publiziert in ²⁹³). HA-VSMCs wurden mit 5 mg / l Actinomycin D für 1 h vorinkubiert und anschließend additiv für weitere 24 h mit 10 nM Aldosteron stimuliert (A). Für die miR-29a- und miR-29c-Mengen zeichnete sich kein signifikanter Effekt weder durch Aldosteron noch durch Actinomycin D mit Aldosteron ab. Einzig der miR-29b-Gehalt wurde durch Aldosteron reduziert. Eine Actinomycin D-Vorbehandlung der Zellen ließ diesen Effekt verschwinden (B). N = 4; n = 5-6.

Im folgenden Versuch wurden die glatten Gefäßmuskelzellen mit 10 nM Aldosteron vorinkubiert und anschließend mit Actinomycin D behandelt. Nach 0 h, 1 h, 3 h und 6 h wurde RNA isoliert (Abb. 4-19 A).

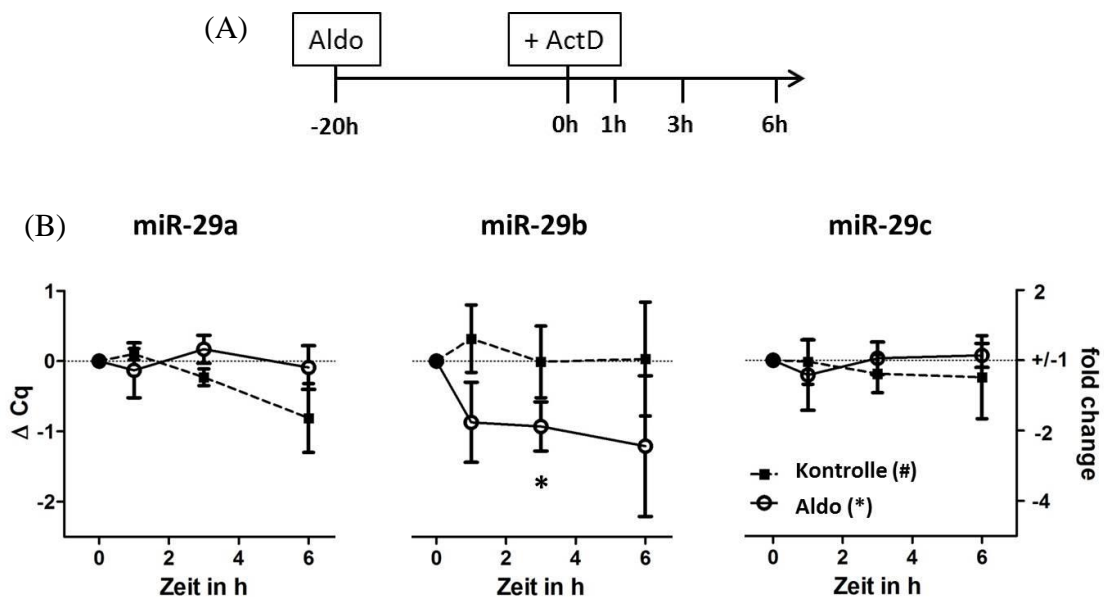


Abbildung 4-19: Gehalt reifer miRs im Actinomycin D-Zeitverlauf (publiziert in ²⁹³). HA-VSMCs wurden zuerst für 20 h mit 10 nM Aldosteron und anschließend mit Actinomycin D (5 mg / l) für 1 h, 3 h und 6 h inkubiert (A). Der Nachweis der reifen miRs zeigte, dass die Konzentrationen an miR-29a, wie auch von miR-29c, unbeeinflusst von Aldosteron waren und über den gemessenen Zeitraum relativ konstant blieben (B). Im Vergleich dazu zeigte miR-29b einen Aldosteron-spezifischen Abbau (B). N = 3; n = 5

Die Mengen an reifer miR-29a zeigten einen stabilen Verlauf während der gemessenen 6 h. Die Kontrollzellen sowie die Aldosteron-behandelten HA-VSMCs zeigten in der miR-29a-Expression keine signifikanten Unterschiede zur 0-Linie (Abb. 4-19 B, links). Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich für die miR-29c-Mengen. Nach Zugabe von Actinomycin D blieben sie über 6 h stabil, unabhängig von der Inkubation (Abb. 4-19 B, rechts). Als einziges Mitglied der miR-29-Familie zeigte miR-29b einen Aldosteron-abhängigen Abbau nachdem die RNA-Neusynthese durch Actinomycin D gehemmt wurde (Abb. 4-19 B, Mitte). Besonders 3 h nach Actinomycin D-Behandlung zeigte miR-29b eine signifikant verringerte Expression um das 1,90-fache ($\Delta\text{Cq} = -0,93$; SEM $\pm 0,35$) verglichen zu Kontrollzellen. Deren miR-29b-Gehalt lag nach 3 h beim 1,01-fachen ($\Delta\text{Cq} = -0,01$; SEM $\pm 0,51$) des Ausgangswerts. Allgemein blieb miR-29b in DMSO-behandelten Zellen über die gemessenen 6 h äußerst stabil (Abb. 4-19 B, Mitte). Als interne Kontrolle wurde die 18S rRNA, wie bei den pri-miRs beschrieben, verwendet, da diese keinem Abbau unterlag.

4.2.4 Aldosteron reduziert miR-29b ausschließlich im Zytoplasol

Durch Kern-Zytoplasma-Zellfraktionierung wurde ermittelt, in welchem Kompartiment die Mitglieder der miR-29-Familie durch das Steroidhormon Aldosteron vorrangig beeinflusst werden.

Wie in Abbildung 4-20 A (links und rechts) dargestellt, zeigte Aldosteron keinen Einfluss auf die Verteilung von miR-29a bzw. miR-29c zwischen Kern und Zytoplasma. Die Menge an miR-29b hingegen wurde als einziges Mitglied der miR-29-Familie signifikant um das 2,19-fache ($\Delta\Delta\text{Cq} = -1,13$; SEM $\pm 0,27$) im Zytoplasma reduziert (Abb. 4-20 A, Mitte). Im Nukleus war kein Aldosteroneffekt auf die miR-29b-Konzentration nachweisbar. Um zu belegen, dass die Fraktionierung von Kern und Zytoplasma erfolgreich verlaufen war, wurden zum einen die Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität gemessen (Vorkommen im Zytoplasol) und zum Anderen die U6 snRNA detektiert, da diese vorrangig im Nukleus lokalisiert ist. Wie aus Abbildung 4-20 B (links) hervorgeht, sind nur 4,4 % (SEM $\pm 0,51$ %) an LDH-Aktivität im Nukleus nachweisbar, verglichen zum Zytoplasma. Hinsichtlich der U6-Verteilung wurde gemessen, dass zwischen Kern und Zytoplasol in der qPCR zirka zwei Zyklen Unterschied

bestanden (4-20 B, rechts). Demnach war in der Kernfraktion zirka viermal mehr U6 vorhanden als in der zytoplasmischen Fraktion. Beide Fraktionierungsnachweise belegen somit, dass die Trennung der Kompartimente erfolgreich verlief.

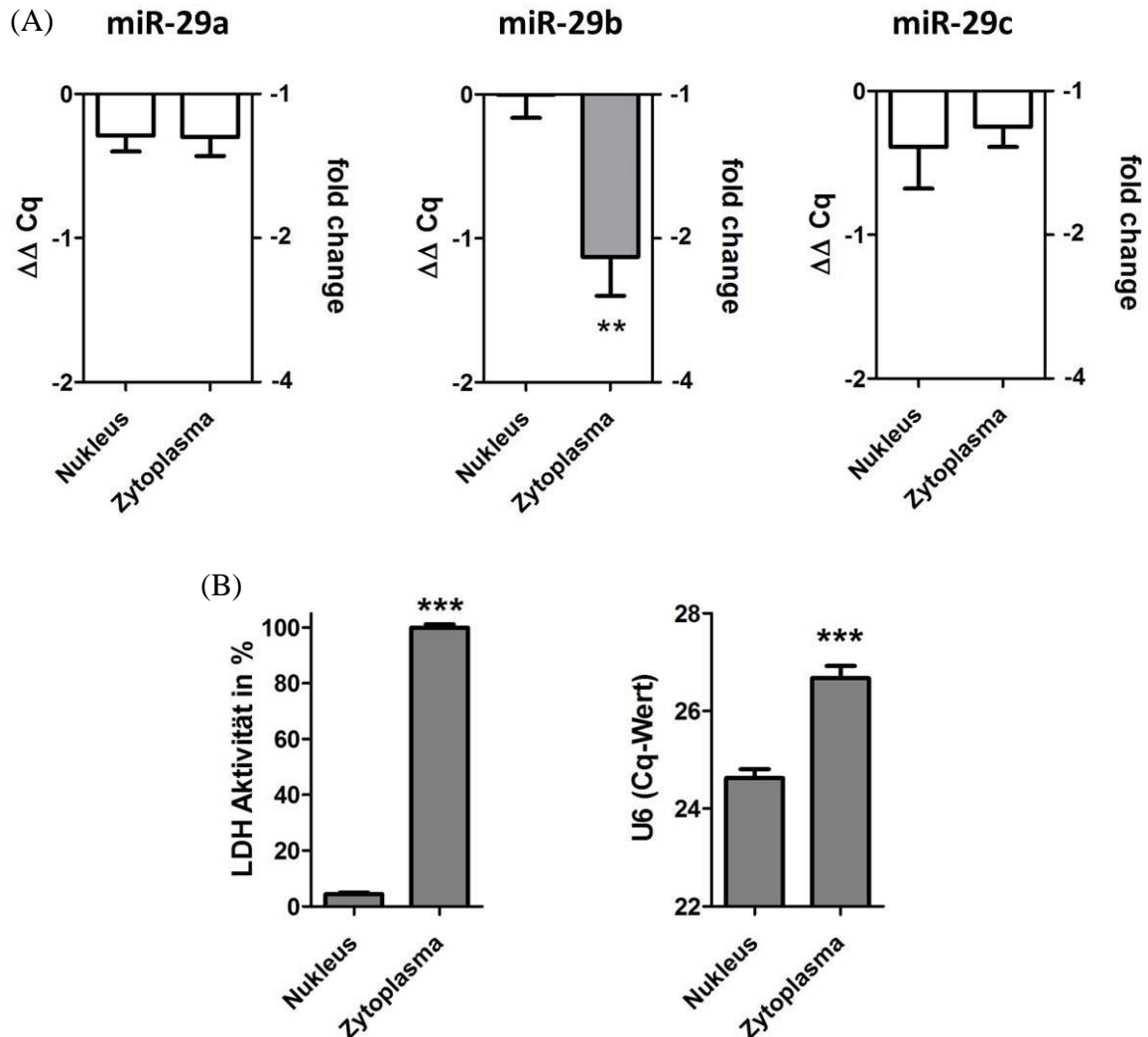


Abbildung 4-20: Einfluss von Aldosteron auf die Verteilung der miR-29-Familie zwischen Kern und Zytoplasma. Die Menge an miR-29a und miR-29c blieben nach Aldosteronstimulation im Kern und Zytoplasma unverändert. Demgegenüber wurde der miR-29b-Gehalt einzig im Zytoplasma signifikant reduziert. Im Kern wurde keine Änderung der miR-29b-Menge detektiert (A). Um zu belegen, dass die Fraktionierung erfolgreich war, wurde zum einen die Aktivität von zytoplasmischer Laktat-Dehydrogenase bzw. die im Kern lokalisierte U6 bestimmt (B). N = 3-4; n = 6-8

4.2.5 Diskussion

Während der miR-Reifung gibt es verschiedene Prozessierungsebenen, welche durch Regulatorproteine beeinflusst werden können. Um zu untersuchen über welchen Mechanismus Aldosteron die miR-29b reduziert, wurden die Intermediate der miR-

Reifung bezüglich ihrer Steroidhormon-Regulation untersucht. Versuche, in denen zusätzlich der Hemmer der RNA-Neusynthese, Actinomycin D, eingesetzt wurde, sollten Aufschluss über genomische bzw. nicht-genomische MR-Effekte geben.

Aldosteron hat keinen Einfluss auf das primäre Transkript

Wie in Tabelle 4-1 aufgelistet, zeigte Aldosteron weder allein, noch in Kombination mit einer blockierter Transkription (durch Actinomycin D) einen Einfluss auf die primären Transkripte (pri-miRs). Der Aldosteron-aktivierte MR wirkt demnach nicht als Transkriptionsfaktor an den zwei potenziellen miR-29b-enthaltenden Clustern. Darauf deuteten auch die Transkriptmengen an miR-29a und miR-29c hin. Beide miRs werden zwar mit miR-29b co-transkribiert, werden durch Aldosteron jedoch nicht verringert (siehe 4.1.3). Daraus wird geschlossen, dass die Regulation in der weiterführenden Prozessierung der primären Transkripte erfolgen muss.

Tabelle 4-1: Übersicht über miR-29-Intermediate der Reifung bezüglich verschiedener Aldosteron-stimulationen ohne bzw. mit Actinomycin D.

Inkubation	pri-miR-29	pre-miR-29b	reife miR-29b
Aldosteron (Aldo)	↔	↓	↓
Actinomycin D → Aldo	↔	↔	↔
Aldo → Actinomycin D	↔	↔	↓

Aldosteron verringert das Vorläufer-Transkript nur, wenn die RNA-Neusynthese stattfinden kann

In der nächsten miR-Reifungsstufe zeigten die beiden pre-miRs eine signifikante Reduktion durch Aldosteron. Blockierte man jedoch die RNA-Neusynthese vor oder nach Aldosterongabe verschwand der Hormon-abhängige Effekt (Tab. 4-1). Die Aktivität des Mikroprozessor-Komplexes (Drosha-Komplex), welcher pre-miRs aus pri-miRs generiert, kann durch verschiedene Effektormoleküle, wie DEAD-box Helikasen, p53 oder SMAD-Proteine signifikant erhöht werden^{171,172,175,176}. Weitere Regulatoren wie TDP-43 oder LIN-28 beschleunigen ebenfalls die miR-Reifung indem sie mit dem Drosha- wie auch dem Dicer-Komplex interagieren¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Durch die zytoplasmatische RNase III Dicer, im Komplex mit den Cofaktoren TRBP und PACT, wird die

Prozessierung von pre-miR zu reifer miR katalysiert¹⁵⁹. RBM3, ein RNA-bindendes Protein, sowie MCPIP1, eine durch Entzündung induzierte Nuklease, wurden als spezifische Dicer-Regulatoren identifiziert^{185,187}. Ein Einfluss von Aldosteron auf die durch Drosha bzw. Dicer katalysierten Prozessierungsschritte ist in unserem Fall aus den folgenden Gründen unwahrscheinlich. Hemmt man die RNA-Synthese vor Aldosterongabe, ein Fall in dem das Steroidhormon ausschließlich nicht-genomisch wirken kann, war keine Änderung im pre-miR-Gehalt nachzuweisen. Folglich ist dieser Aldosteronmechanismus auszuschließen. Erfolgte die Aldosteronstimulation vorher, konnten über die transkriptionelle MR-Wirkung potenziell Proteine exprimiert werden, welche die pri-miR- bzw. die pre-miR-Prozessierung steuern. Die anschließende Blockierung der Transkription zeigte den MR-Effekt auf den RNA-Abbau und schloß direkte genomische MR-Effekte auf die pre-miRs aus. Würde der aktivierte MR Drosha-regulierende Proteine beeinflussen, müssten die pre-miR-Mengen erhöht bzw. reduziert sein. Gäbe es eine MR-abhängige Regulation des Dicer-Komplexes, so würde man einen erhöhten oder verminderten Umsatz der pre-miRs erwarten. Da in beiden Actinomycin D-Versuchen keine signifikant veränderten pre-miR-Konzentrationen detektiert wurden, wird geschlussfolgert, dass beide Prozessierungsschritte Aldosteronunabhängig ablaufen. Eine Hypothese, warum die pre-miRs durch Aldosteron allein reduziert sind, ist in einer Verschiebung des Fließgleichgewichts zwischen pre-miRs und reifer miR-29b zu finden. Da miR-29b einem verstärkten Abbau unterliegt, wird mehr pre-miR zu reifer miR prozessiert um das Gleichgewicht zu wahren.

Die Aldosteron-abhängige Verringerung der reifen miR-29b enthält eine genomische Komponente

Die Menge an reifer miR-29b, als Endprodukt der miR-Reifung, wird durch Aldosteron reduziert. Wie der Versuch mit Actinomycin D-Vorinkubation zeigte, konnte eine miR-29b-Reduktion aufgrund einer nicht-genomischen MR-Wirkung auch hier, wie bei allen anderen Intermediaten, ausgeschlossen werden, da die miR-29b-Konzentration unverändert blieb (Tab. 4-1). Konnte das Steroidhormon jedoch einige Stunden wirken und erst danach wurde die RNA-Neusynthese blockiert, so erfolgte eine selektive Reduktion der miR-29b-Menge wie unter Aldosteronstimulation allein. Es ist bereits bekannt, dass ein Uridin-reiches Element an Position 9 - 11 für den schnellen Abbau der miR-29b verantwortlich ist²¹³. Grundlegend ist beschrieben, dass miRs äußerst stabil

sind und Halbwertszeiten zwischen 28 h und 220 h haben können^{205,206}. Eine hohe Stabilität konnten wir für alle Mitglieder der miR-29-Familie unter Kontrollbedingungen sowie für miR-29a und miR-29c nach Aldosteronstimulation bestätigen. Einzig die miR-29b-Menge wurde nach Inkubation mit dem Steroidhormon verringert. Daraus wird geschlussfolgert, dass der Aldosteron-aktivierte MR in seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor direkt oder indirekt ein miR-29b-Bindeprotein steuert, welches die Halbwertszeit der miR-29b selektiv beeinflusst. Dabei könnte es sich um eine verminderte Expression eines miR-29b-stabilisierenden Proteins handeln bzw. um eine erhöhte Expression miR-29b-spezifischer Ribonukleasen. Ein Beispiel für ein miR-spezifisches Stabilisierungsprotein ist das QKI. Es wurde für miR-20a in humanen Zellen identifiziert, wobei andere miRs des gleichen Cluster einem Abbau unterlagen²⁰⁹. Dem, durch unsere Daten nachgewiesenen, selektiven Abbau der miR-29b könnte ein vergleichbarer kontroverser Mechanismus zugrunde liegen, der selektiv die Stabilität von miR-29b senkt anstatt erhöht.

Aldosteron verringert den miR-29b-Gehalt im Zytoplasma

Untersuchungen zur subzellulären Regulation reifer miRs durch Aldosteron sollten weiteren Aufschluss über eine potenzielle Kompartimenten-Spezifität geben. Wie die Nachweise von LDH und U6 snRNA belegten, konnten wir Zellkern und Zytoplasma glatter Gefäßmuskelzellen erfolgreich trennen. Es ist bekannt, dass miR-29a hauptsächlich im Zytoplasma vorliegt, wohingegen sich ein Großteil der miR-29b im Zellkern befindet. Ein spezielles Hexanukleotid am 3' terminalen Ende der miR-29b ist dabei für den Kernimport verantwortlich²¹⁰. Ein miR-29b-selektives Cargoprotein, CRM1, welches den Transport zwischen Kern und Zytoplasma vermittelt, konnte ebenfalls identifiziert werden²⁵⁶. Wir konnten nachweisen, dass Aldosteron den miR-29b-Gehalt ausschließlich im Zytoplasma um zirka die Hälfte reduziert. Im Zellkern, wo höhere Konzentrationen an miR-29b zu erwarten wären, zeigte sich kein Effekt, was auf eine Zytoplasma-spezifische Regulation hinweist. MiR-29a, die als vorwiegend im Zytoplasma vorliegend beschrieben wurde, zeigte keine Aldosteronabhängigkeit, genau wie miR-29c.

Potenzieller Mechanismus der miR-29b-Regulation

Um unsere Erkenntnisse zur Regulationsebene der miR-29b zusammenzufassen, wurde eine Hypothese erstellt wie Aldosteron die Stabilität reifer miR-29b beeinflusst. In Abbildung 4-21 ist diese schematisch dargestellt.

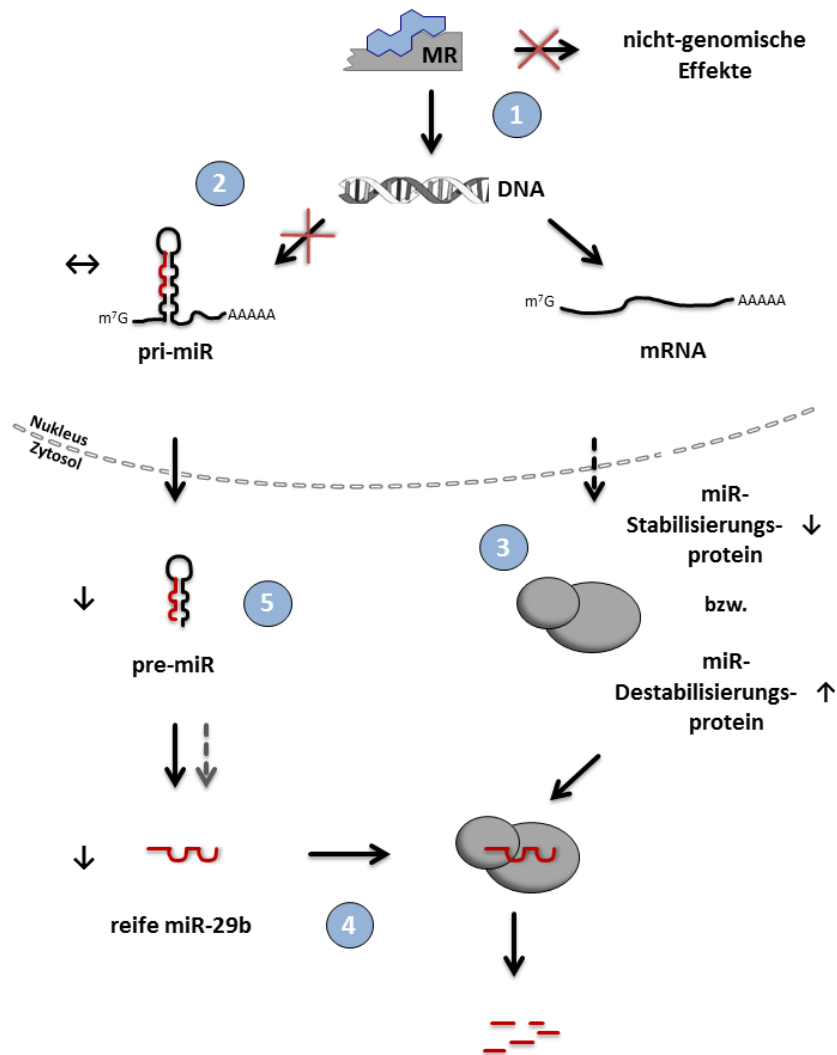


Abbildung 4-21: Schema der potenziellen miR-29b-Regulation.

Dabei wirkt der Aldosteron-aktivierte MR klassisch als Transkriptionsfaktor an der DNA, wobei nicht-genomische Effekte für die miR-29b-Regulation ausgeschlossen werden können (Schritt 1). Er reguliert dabei nicht die Transkription der miR-29b-Gene (Schritt 2), sondern beeinflusst direkt oder indirekt die Expression eines miR-29b-selektiven Proteins (Schritt 3). Es ist anzunehmen, dass ein spezifisches miR-Stabilisierungsprotein reduziert bzw. ein miR-Destabilisierungsprotein erhöht wird.

Dieses Protein führt zur selektiven Reduktion zytoplasmatischer miR-29b in glatten Gefäßmuskelzellen (Schritt 4). Im Ende führt der verstärkte Abbau reifer miR-29b zu einer Verschiebung des Fließgleichgewichts, wodurch auch pre-miR-29b-1 und -29b-2 einem erhöhten Abbau unterliegen (Schritt 5).

4.3 Wirkung von miR-29b auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen

Der MR verändert in seiner pathologischen Funktion aktiv die Gefäßhomöostase. Diesbezüglich war es wichtig zu untersuchen, ob die Aldosteron-abhängige miR-29b ebenfalls einen Einfluss auf Remodeling-Prozesse aufweist. Wichtige Faktoren, die im Krankheitsverlauf verändert sein können, sind neben der Bildung extrazellulärer Matrix, die Zellmotilität, das Zellwachstum bezüglich Zellgröße und Proliferation sowie das Zellüberleben. Dies sind alles Parameter, welche im Verlauf der Entdifferenzierung (auch Phänotyp-Wechsel oder *phenotypic switch* genannt) glatter Gefäßmuskelzellen beeinflusst sein können. Im folgenden Abschnitt wurde durch Überexpression bzw. Inhibierung der miR-29b der Einfluss dieser miR auf den *phenotypic switch* glatter Gefäßmuskelzellen näher untersucht.

4.3.1 MiR-29b reduziert Komponenten der extrazellulären Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) besteht hauptsächlich aus Faserkomponenten und Grundsubstanz und ist im Interzellularraum lokalisiert. Die Grundsubstanz wird vorwiegend aus Glykosaminoglykanen, Glykoproteinen (z.B. Fibronectin) und Adhäsionsproteinen gebildet. Die Fasern hingegen bestehen aus verschiedenen Kollagenen und Elastin. Um zu untersuchen welchen Einfluss miR-29b auf diese Komponenten hat, wurden Kollagen I, III, IV und Fibronectin als Marker für die extrazelluläre Matrix ausgewählt und untersucht.

4.3.1.1 mRNA-Gehalt

Wie aus der Literatur bereits bekannt ist, besitzen die untersuchten Komponenten der extrazellulären Matrix eine miR-29b-Zielsequenz in ihrem 3'UTR. Eine Regulation dieser Bestandteile durch miR-29b speziell in glatten Gefäßmuskelzellen wurde jedoch

noch nicht erforscht. Der mRNA-Gehalt an Kollagen I, III, IV und Fibronektin wurde mittels qPCR ermittelt.

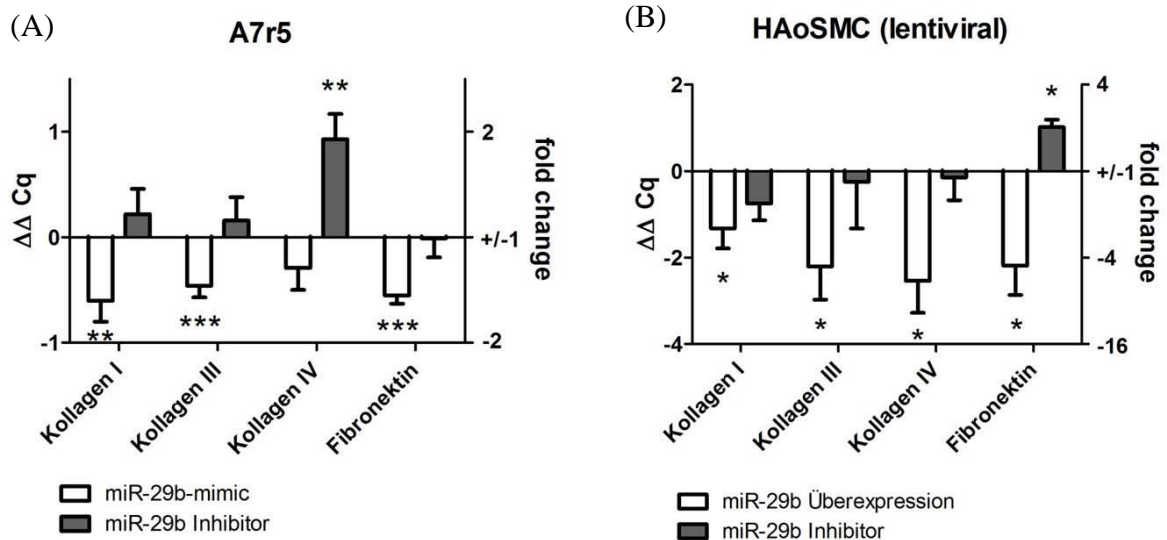


Abbildung 4-22: MiR-29b beeinflusst die mRNA-Menge von diversen Kollagenen und von Fibronektin (publiziert in ²⁹³). In A7r5 Zellen sowie HAoSMCs zeigte ein Überschuss an miR-29b eine reduzierende Wirkung auf EZM. Eine Inhibierung der miR-29b resultierte in einer Erhöhung der Kollagen IV-mRNA in A7r5 Zellen (A) und der Fibronektin-mRNA in HAoSMCs (B). N = 4-5; n = 4-16

In A7r5 Zellen wurden durch eine erhöhte Menge an miR-29b die Kollagen I-, III- und Fibronektin-mRNAs signifikant reduziert (Abb. 4-22 A). Die mRNA-Menge von Kollagen I wurde dabei um das 1,52-fache ($\Delta\Delta Cq = -0,60$; SEM $\pm 0,20$) gesenkt und von Kollagen III um das 1,37-fache ($\Delta\Delta Cq = -0,46$; SEM $\pm 0,11$). Der mRNA-Gehalt an Fibronektin wurde durch miR-29b-Mimic signifikant um das 1,46-fache ($\Delta\Delta Cq = -0,55$; SEM $\pm 0,08$) reduziert. Demgegenüber zeigte eine Inhibierung der miR-29b einzig einen Effekt auf die Kollagen IV-mRNA. Ihr Gehalt wurde um das 1,90-fache ($\Delta\Delta Cq = 0,93$; SEM $\pm 0,24$) signifikant erhöht (Abb. 4-22 A).

Neben den Untersuchungen der A7r5 Zellen wurden auch lentiviral transfizierte HAoSMCs bezüglich EZM-mRNA analysiert. Dabei zeigte sich, dass die mRNAs aller Kollagene sowie von Fibronektin durch eine miR-29b-Überexpression signifikant reduziert wurden (Abb. 4-22 B). Durch die stabilere lentivirale Überexpression erreichte man zirka dreifach stärkere Effekte verglichen zu den transient transfizierten A7r5 Zellen. Bezogen auf die verschiedenen Komponenten wurden Reduktionen von 2,50-fach (Kollagen I) bis 5,80-fach (Kollagen IV) erreicht (Abb. 4-22 B). Die Transfektion eines *Decoy*-Inhibitors zeigte keinen Einfluss auf die drei untersuchten Kollagene.

Einzig die mRNA-Menge von Fibronectin wurde auf das 2,03-fache ($\Delta\Delta Cq = 1,02$; SEM $\pm 0,17$) erhöht (Abb. 4-22 B).

Die direkte Gegenüberstellung der Zelllinie glatter Gefäßmuskelzellen A7r5 und den primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen HAoSMC zeigte somit qualitativ vergleichbare Effekte.

4.3.1.2 MiR-29b – mRNA Duplexbildung

Um zu analysieren, wie stark die Bindung der miR-29b an ihr Zieltranskript des jeweiligen extrazellulären Matrixproteins ist, wurden *in silico* miR-29b – mRNA-Duplexe generiert (RNA-Hybrid-Tool der Uni Bielefeld; <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html>) (Abb. 4-23). Der *mfe*-Wert (*minimum free energy*) gibt die jeweilige Bindungsenergie zwischen miR-29b und der mRNA an. Je negativer der Wert, desto stärker ist die Bindung.

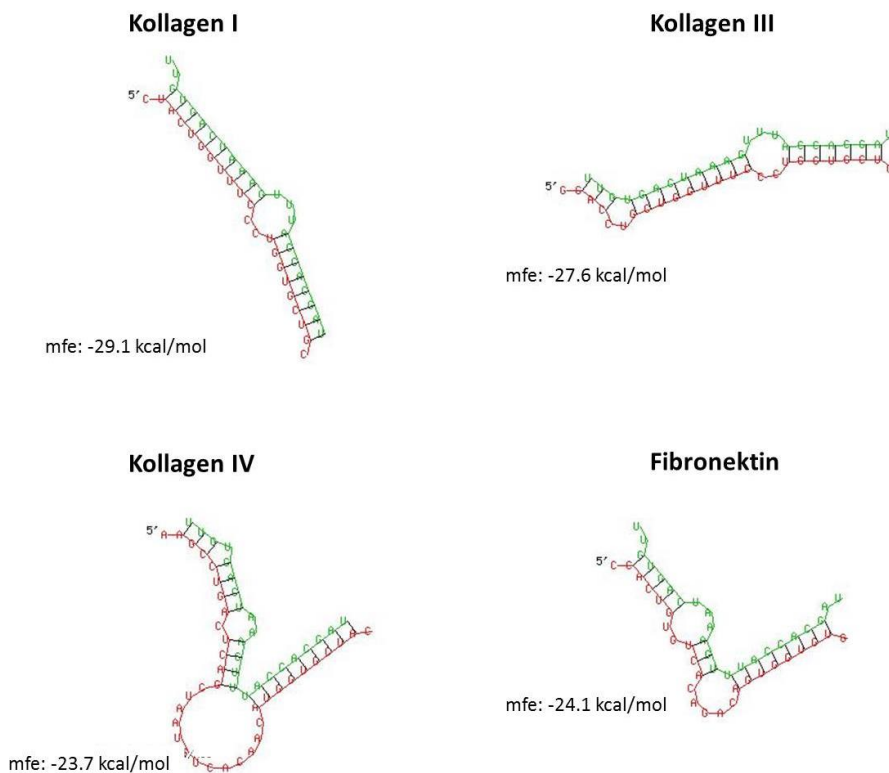


Abbildung 4-23: Duplexbildung der miR-29b mit dem 3'UTR der Zieltranskripte. Die Sequenz der miR-29b ist in Grün, die des jeweiligen 3'UTRs des Zieltranskripts in Rot dargestellt.

Kollagen I weist von den vier untersuchten Matrixprotein-mRNAs, die höchste Bindungsenergie im Heteroduplex auf und bindet miR-29b komplementär über 17

Nukleotide. Die geringste Bindungsenergie besteht zwischen miR-29b und Kollagen IV. Verglichen zueinander liegen die Bindungsenergien jedoch in einem vergleichbaren Wertebereich da sie maximal 5,4 kcal/mol auseinander liegen.

4.3.1.3 Protein-Gehalt

Um Aussagen über die Protein-Expression diverser Kollagene und von Fibronektin treffen zu können, wurden ELISAs durchgeführt. Dabei wurde mit dem Zellüberstand gearbeitet, da es sich bei Kollagenen und Fibronektin um sekretorische Proteine handelt.

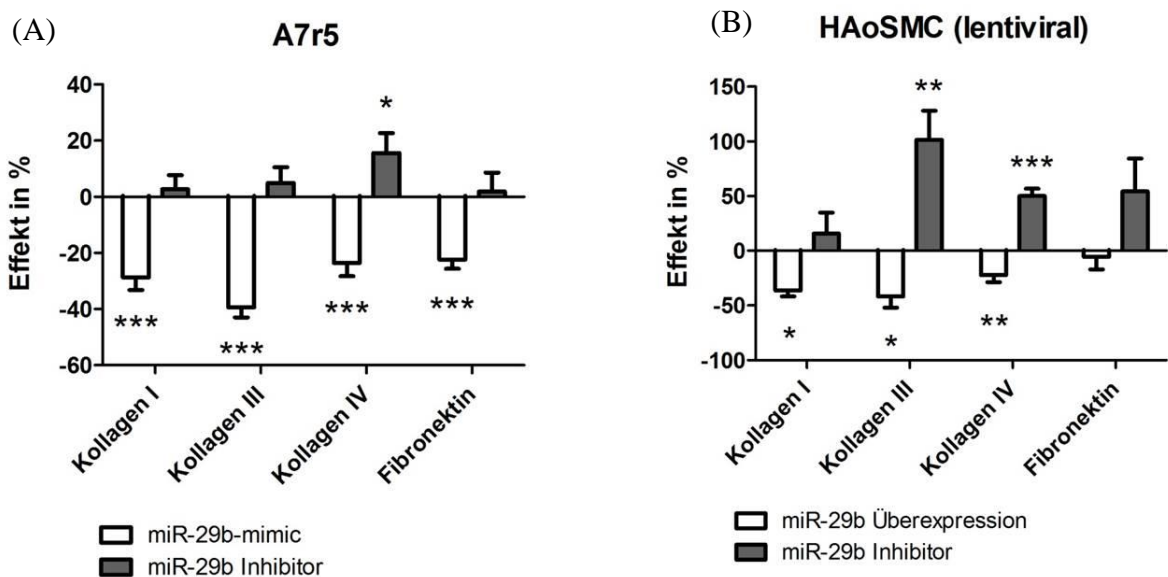


Abbildung 4-24: MiR-29b beeinflusst die Proteinmenge diverser Kollagene und Fibronektin (publiziert in ²⁹³). Kollagen I, III, IV und Fibronektin wurden bezüglich ihrer miR-29b-Abhängigkeit in A7r5 Zellen sowie in HAoSMCs untersucht. In A7r5 Zellen waren alle untersuchten extrazellulären Matrixkomponenten signifikant reduziert, wenn miR-29b im Überschuss in den Zellen war. Durch den miR-29b-Inhibitor war lediglich Kollagen IV als Protein signifikant erhöht. Bei den lentiviral transfizierten HAoSMCs zeigten alle Kollagene eine signifikant verminderte Expression durch einen erhöhten miR-29b-Spiegel. Durch Inhibierung der miR-29b waren die Kollagen III und IV-Proteine verstärkt exprimiert. N = 4-6 ; n = 11-36

Durch die Transfektion von 30 nM miR-29b-Mimic wurden alle untersuchten extrazellulären Matrixkomponenten in A7r5 Zellen signifikant reduziert. Bei den Kollagenen verzeichnete man eine Abnahme von 28,7 % (SEM ± 4,5 %) bei Kollagen I, 39,4 % (SEM ± 3,5 %) bei Kollagen III sowie 23,6 % (SEM ± 4,7 %) bei Kollagen IV. Die Proteinmenge an Fibronektin sank um 22,4 % (SEM ± 3,3 %) (Abb. 4-24 A). Um zu untersuchen, ob eine Inhibierung der miR-29b den gegensätzlichen Effekt erzielt, transfizierte man einen spezifischen Inhibitor. Einzig Kollagen IV wurde um 15,6 %

(SEM \pm 7,1 %) erhöht in Resonanz auf die verminderte miR-29b-Menge. Die Expressionsniveaus aller anderen analysierten Komponenten blieben unverändert (Abb. 4-24 A).

In den lentiviral transfizierten HAoSMCs wurden vergleichbare Effekte wie in den transient transfizierten A7r5 Zellen erreicht. Die Überexpression der miR-29b reduzierte die Proteinmenge aller untersuchten Kollagene. Für Kollagen I wurden somit 36,3 % (SEM \pm 5,5 %), für Kollagen III 41,7 % (SEM \pm 10,2 %) und für Kollagen IV 22,3 % (SEM \pm 6,3 %) weniger Protein gemessen (Abb. 4-24 B). Inhibierung der miR-29b durch einen *Decoy* erhöhte die Expression von Kollagen III um 101,5 % (SEM \pm 26,5 %) sowie von Kollagen IV um 50,0 % (SEM \pm 6,8 %). Fibronektin zeigte weder auf miR-29b-Überexpression (-5,4 % \pm 11,6 %) noch -Inhibierung (54,2 %, SEM \pm 30,1 %) signifikante Veränderungen (Abb. 4-24 B).

4.3.1.4 Diskussion

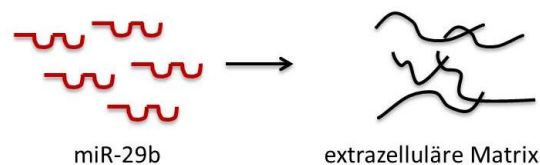
Kommt es zu einer krankhaften Vermehrung extrazellulärer Matrix so spricht man von einer Fibrose, welche das Gewebe des betroffenen Organs verhärtet und im fortgeschrittenen Stadium die Organfunktion einschränkt. Der anti-fibrotische Einfluss von miR-29b ist in diversen Geweben, wie Niere, Herz, Gefäßen aber auch Lunge und Leber bekannt. Dabei sind die Gene verschiedener extrazellulärer Matrixkomponenten, wie Kollagene, Laminin γ 1, Fibrillin, Elastin, Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) sowie Integrin β 1 potenzielle Zieltranskripte von Mitgliedern der miR-29-Familie. Eine verminderte renale Fibrose konnte bereits direkt auf eine gesteigerte miR-29b-Konzentration zurückgeführt werden²⁵⁵. Weiterhin wurde im Mausmodell belegt, dass eine tubulointestinale Fibrose mit reduzierter miR-29b-Menge einhergeht. Diese spezifische Reduktion der miR-29b wurde durch TGF- β - und SMAD3-Signalwege vermittelt²⁵⁴. Vergleichbare Effekte wurden auch im Herzen nachgewiesen, wo TGF- β wie auch geringe miR-29b-Konzentrationen die Entstehung von Fibrose fördern^{229,267,268}. In der Aortenentwicklung von Mäusen hält miR-29b diverse extrazelluläre Matrixkomponenten gering und schützt so vor Remodeling²⁶⁹. Des Weiteren spielt miR-29b in der Pathologie des abdominalen Aortenaneurysma (AAA) eine wichtige Rolle. Durch eine erhöhte miR-29b-Expression und resultierender Verminderung

verschiedener Matrixproteinen ist die Festigkeit und Stabilität der Gefäßwand beeinträchtigt und die Entstehung eines AAA wird begünstigt^{227,228}.

Durch unsere Daten können wir die beschriebene anti-fibrotische Wirkung der miR-29b auf VSMCs erweitern. Unsere Überexpressionsversuche stützen zudem die Studien zu AAAs, da eine erhöhte miR-29b-Menge die Proteine von Kollagen I, III und IV in primären humanen VSMCs reduziert und somit zur Destabilisierung der Gefäßwand beitragen kann. In der A7r5 Zelllinie wurde zusätzlich das Fibronectin-Protein verringert. Ergänzend konnte gezeigt werden, dass miR-29b in humanen VSMCs die mRNA aller untersuchten Kollagene sowie Fibronectin 2- bis 4-fach reduziert. Betrachtet man diesbezüglich die Heteroduplex-Bildung, der 3'UTRs mit miR-29b, so scheinen die ähnlichen Bindungsenergien zu einem vergleichbaren Abbau der verschiedenen extrazellulären Matrix mRNAs zu führen. Weiterhin kann man anhand der Daten ausschließen, dass es sich bei der miR-Regulation um eine Inhibierung der Translation handelt, da in diesem Fall das Transkript noch immer nachweisbar wäre. Ein Abbau durch endonukleolytische Spaltung oder Deadenylierung ist für die mRNAs der Matrixproteine wahrscheinlich.

Da unsere Versuche gezeigt haben, dass miR-29b durch pathologische Aldosteronkonzentrationen reduziert wird, war es von Interesse miR-29b-Inhibitor-vermittelte Effekte zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Proteine von Kollagen III und IV in den primären humanen VSMCs bis zu 100 % erhöht sind. In der A7r5 Zelllinie ist Kollagen IV sowohl auf mRNA-, wie auch auf Proteinebene erhöht.

physiologisch



pathophysiologisch

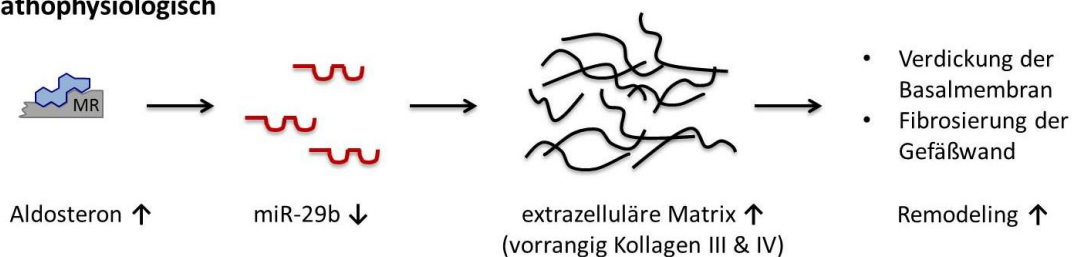


Abbildung 4-25: Hypothese zur Regulation extrazellulärer Matrix durch Aldosteron.

Kollagen III ist ein Fibrillen-bildendes Protein, welches vorrangig in der Lamina fibroreticularis vorzufinden ist. Kollagen IV hingegen bildet ein Faser-Netzwerk und ist ausschließlich in der Basallamina exprimiert. Basallamina und Lamina fibroreticularis bilden zusammen die Basalmembran, welche das Endothel zu tieferen Gewebsschichten hin abtrennt. Kommt es zur vermehrten Bildung und Sezernierung der beiden Kollagene, so wäre eine signifikante Verdickung der Basalmembran die Folge. Der Stoffaustausch und die Kommunikation zwischen Endothel und glatten Gefäßmuskelzellen wären gestört und könnten zur Entwicklung vaskulärer Erkrankungen beitragen. Eine durch Aldosteron-vermittelte miR-29b-Reduktion würde so effektiv pathologische Remodeling-Prozesse in Gefäßen unterstützen (Abb. 4-25). Der Einsatz von miR-29b-Mimics zur Behandlung von Fibrose im Menschen wird derzeit in präklinischen Studien intensiv erforscht ²⁹⁸.

4.3.2 MiR-29b vermindert die Motilität glatter Gefäßmuskelzellen

Die Motilität glatter Gefäßmuskelzellen ist ein weiterer wichtiger Aspekt in der Gefäßpathologie, da sie dadurch zelluläre Lücken erreichen und ausfüllen können. Um die verschiedenen Parameter einzeln zu untersuchen, welche bei der Zellmotilität mitwirken, wurden sie mittels Wundheilungs-Assays, Migration (Einzelzellanalyse) sowie hinsichtlich der Adhärenz glatter Muskelzellen analysiert.

4.3.2.1 Wundheilungs-Assays

Mit Hilfe des Wundheilungs-Assays wird die Fähigkeit von Zellen untersucht einen zellfreien Raum zu besiedeln. Die Versuche wurden in Serum-haltigem Medium durchgeführt, um so nah wie möglich physiologische Bedingungen widerzuspiegeln. Hierbei spielen neben der Migration auch die Zellproliferation und das Zellvolumen eine Rolle. Diese Parameter wurden unter 4.3.2.2. und 4.3.3.1. untersucht.

Mittels transient transfizierter A7r5 Zellen wurde der „Lückenschluss“ nach verschiedenen Zeitpunkten und in Abhängigkeit von miR-29b gemessen. Dabei ergab sich, dass Zellen mit Überschuss an miR-29b, den zellfreien Spalt nicht so schnell schließen konnten wie mit scramble-miR transfizierte Kontrollzellen. Demgegenüber waren mit

miR-29b-LNA-Inhibitor transfizierte Zellen in der Lage die Lücke schneller zu schließen als die Vergleichsgruppe (Abb. 4-26 A).

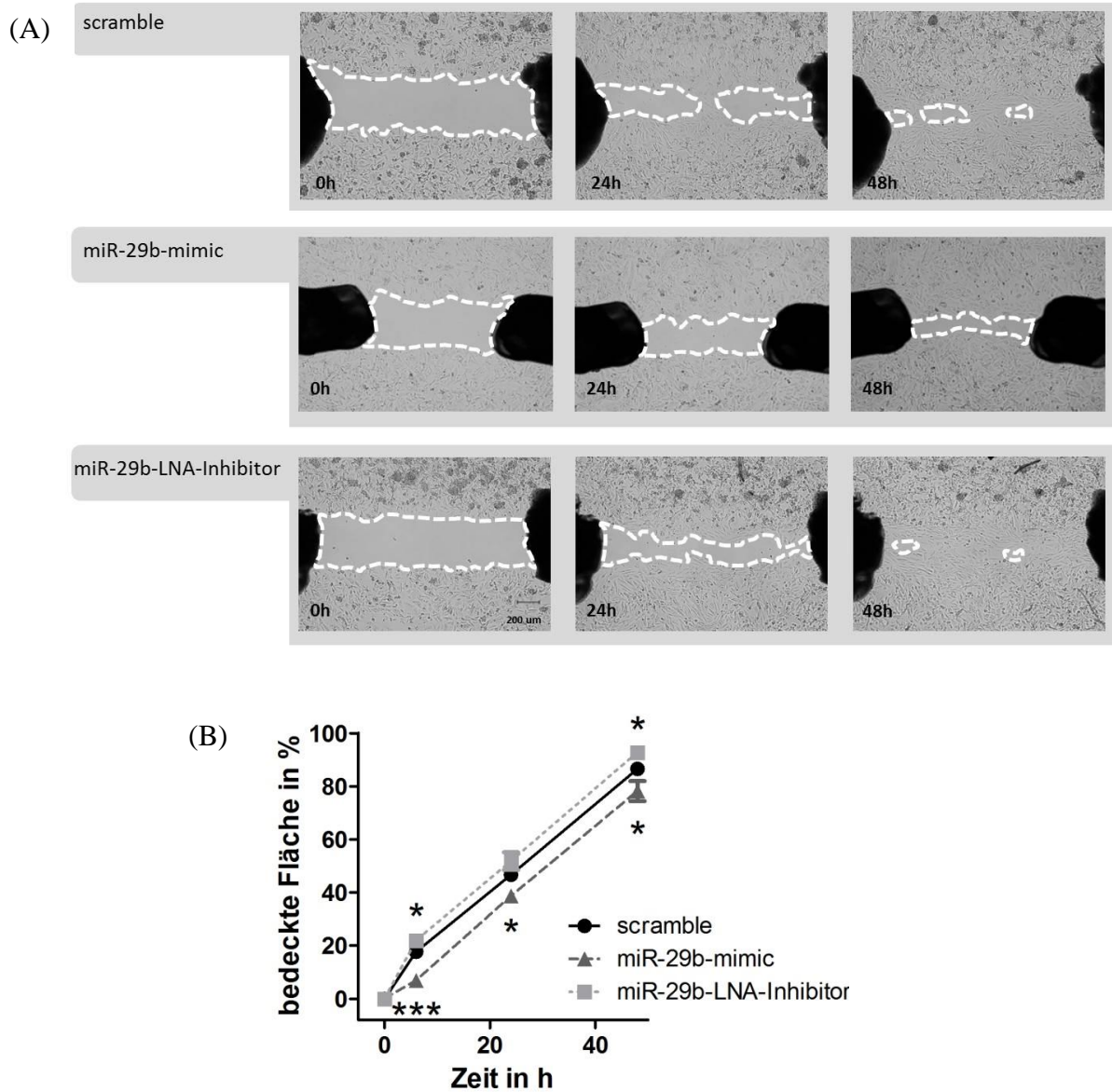


Abbildung 4-26: MiR-29b verlangsamt die Wundheilung bei A7r5 Zellen (publiziert in ²⁹³). Mittels Wundheilungsversuchen wurde gemessen, wie schnell die Zellen im Stande waren den zellfreien Raum zu schließen. Verglichen mit Kontrollzellen (scramble) war der Wundverschluss bei Zellen mit miR-29b-Überschuss langsamer und deutlich schneller bei Zellen, wo miR-29b inhibiert wurde (A). Die Zusammenfassung mehrerer Messungen ergab, dass diese Effekte über einen Zeitraum von 48 h signifikant waren (B). N = 3-12; n = 13-37

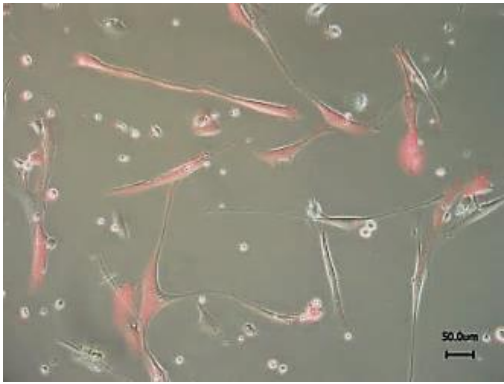
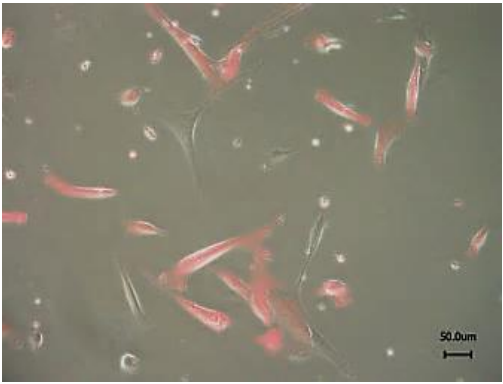
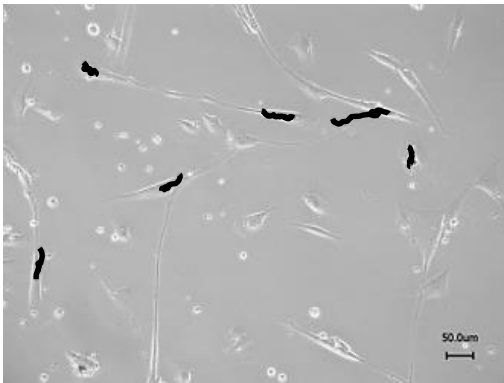
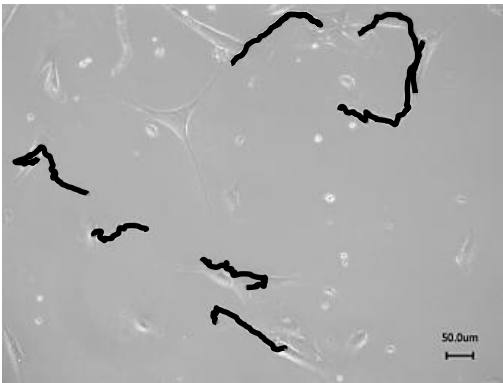
Die Auswertung mehrerer Versuche bestätigte die durch Abbildung 4-26 A aufgestellte Hypothese. Während Kontrollzellen binnen 6 h bereits 17,71 % (SEM \pm 1,28 %) der Fläche bedeckt hatten, waren es bei den mit miR-29b-Mimic transfizierten Zellen nur 6,93 % (SEM \pm 0,08 %). Dieser Effekt zeichnete sich auch nach 24 h und nach 48 h

signifikant ab (Abb. 4-26 B). Die Inhibierung der miR-29b zeigte einen gegensätzlichen Einfluss. Der miR-29b-LNA-Inhibitor bewirkte, dass die Zellen bereits nach 6 h 21,93 % (SEM \pm 1,05 %) der zellfreien Fläche bedeckt hatten. Genau wie nach 6 h, so war dieser Effekt auch nach 48 h signifikant gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 4-26 B).

4.3.2.2 Migration (Einzelzellanalysen)

Um die Migration der Zellen separat zu untersuchen wurden Einzelzell-Tracking-Analysen durchgeführt. Dazu wurden lentiviral transfizierte HAoSMCs verwendet, bei welchen man durch einen roten Fluoreszenzfarbstoff unterscheiden konnte, welche Zellen den lentiviralen Plasmid aufgenommen hatten und somit eine miR-29b-Spezifikation exprimierten (Tab. 4-2, obere Zeile). Untransfizierte Zellen wurden ebenfalls vermessen und als negative Kontrolle verwendet.

Tabelle 4-2: Migrationswege der lentiviral transfizierten HAoSMCs (publiziert in ²⁹³). Als Transfektionsnachweis wurde Crimson (roter Fluoreszenzfarbstoff) als Kontrolle co-exprimiert. Rot leuchtende Zellen wurden in ihrer Migration nachverfolgt (Overlay-Bilder). Untransfizierte, nicht leuchtende Zellen wurden als Kontrolle ebenfalls vermessen. Die Routen zeigten deutlich, dass Zellen, welche miR-29b überexprimierten, binnen 4 h langsamer migrierten als solche, bei denen miR-29b inhibiert wurde.

	miR-29b-Überexpression	miR-29b-Inhibitor
Transfektionsnachweis		
Route der transfizierten Zellen		

Bereits bei den Migrationswegen zeigten sich eindeutig gegensätzliche Effekte der miR-29b-Überexpression im Vergleich zur miR-29b-Inhibierung. Zellen die einen Überschuss an miR-29b hatten, migrierten in 4 h bedeutend langsamer als Zellen, bei welchen der miR-29b-Gehalt vermindert war (Tab. 4-2, untere Zeile).

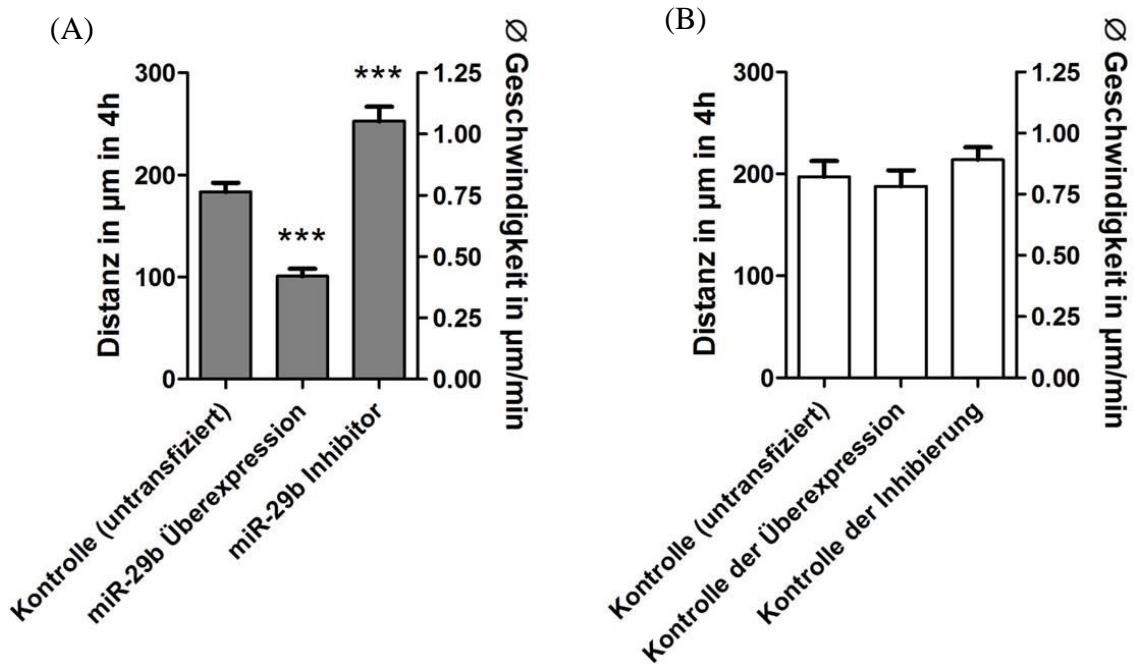


Abbildung 4-27: MiR-29b inhibiert die Migration lentiviral transfizierter HAoSMCs (publiziert in ²⁹⁵). Durch Überexpression der miR-29b wurde die zurückgelegte Wegstrecke der HAoSMCs stark reduziert (A). Den gegensätzlichen Effekt konnte man bei Zellen verzeichnen, welche reduzierte Konzentrationen an miR-29b aufwiesen. Im Vergleich zur Kontrolle wurde die Migration signifikant beschleunigt (A). HAoSMCs, welche mit Kontrollplasmiden transfiziert wurden, zeigten keine Veränderungen im Migrationsverhalten (B). N = 5, n = 27-52

Innerhalb von 4 h migrierten untransfizierte HAoSMCs 183,5 µm (SEM ± 8,8 µm), was einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,78 µm / min entspricht (Abb. 4-27 A, links). Im Vergleich dazu wurde die Distanz deutlich reduziert, wenn die Zellen miR-29b überexprimierten. Binnen 4 h legten diese Zellen nur noch eine Strecke von 100,9 µm (SEM ± 7,3 µm) zurück was einer Reduktion um 45,0 % gleich kam, verglichen zur Kontrolle (Abb. 4-27 A, Mitte). Die Inhibierung der miR-29b hatte eine Erhöhung der zurückgelegten Wegstrecke zur Folge. Jene Zellen steigerten ihre Migration um 37,7 % und legten damit eine Strecke von 252,7 µm (SEM ± 14,2 µm) in 4 h zurück. Dies entsprach einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 1,08 µm / min (Abb. 4-27 A, rechts).

HAoSMCs, welche mit den gleichen Plasmiden, jedoch ohne miR-29b-Spezifikation, transfiziert wurden, zeigten kein verändertes Migrationsverhalten verglichen zu

untransfizierten Zellen (Abb. 4-26 B). Die migrierten Wegstrecken lagen hier zwischen 187,9 μm (SEM \pm 15,7 μm) für die Kontrolle der Überexpression und 213,8 μm (SEM \pm 12,3 μm) für die Inhibitor-Kontrolle in den gemessenen 4 h.

4.3.2.3 Adhärenz

Die Adhärenz von glatten Gefäßmuskelzellen ist ein weiterer Faktor, der die Motilität beeinflusst. Zellen heften sich vor allem mit der Leitkante ihren Lamellopodien an und ermöglichen so eine Fortbewegung²⁹⁹. Um effizient zu migrieren, muss ein stetiger Wechsel zwischen Anheftung und Ablösen der Zell-Untergrund-Kontakte stattfinden³⁰⁰. Um die Adhärenz von A7r5 Zellen in Abhängigkeit von miR-29b zu bestimmen, wurden 24 h nach der Transfektion je 60000 Zellen pro Petrischale angesät. Nach 6 h, in denen sich die Zellen an den Untergrund anheften konnten, wurden sie gewaschen und anschließend ihre Zellzahl bestimmt.

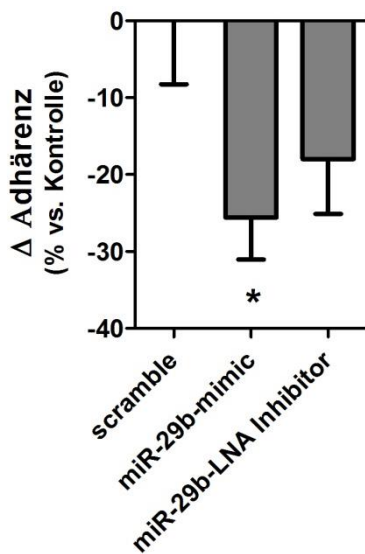


Abbildung 4-28: Anzahl haftender A7r5 Zellen 6 h nach Ansaat. Je 60000 A7r5 Zellen wurden 24 h nach der Transfektion angesät und die Zahl an haftenden Zellen nach 6 h im Casy Zellzähler ermittelt. Bei den mit scramble-miR transfizierten Kontrollzellen wurden im Durchschnitt 36473 Zellen gemessen, während bei den mit 29b-Mimic bzw. LNA-Inhibitor Transfizierten nur 27393 bzw. 26287 Zellen anhafteten. N = 3-10; n = 9-24

Die Analyse ergab, dass Zellen, welche einen Überschuss an miR-29b aufwiesen, eine signifikant verringerte Adhärenz um 25,6 % (SEM \pm 5,5 %) zeigten. Bei Zellen mit verringertem miR-29b-Gehalt hafteten 18,0 % (SEM \pm 7,1 %) weniger Zellen als in der Kontrollgruppe, was jedoch nicht die Signifikanz erreichte (Abb. 4-28). Diese Werte zeigen deutlich, dass eine bestimmte Konzentration an miR-29b für die Adhärenz entscheidend ist.

erreichte (Abb. 4-28). Diese Werte zeigen deutlich, dass eine bestimmte Konzentration an miR-29b für die Adhärenz entscheidend ist.

4.3.2.4 Diskussion

Ein wichtiges Merkmal entdifferenzierter VSMCs, wie sie unter pathologischen Bedingungen vorzufinden sind, ist eine beschleunigte Motilität. Besonders für die Entstehung von Arteriosklerose ist bekannt, dass sekretorische VSMCs aus der Media in die Intima einwandern können und dadurch die Bildung von Plaques fördern²⁴.

Welche Rolle miR-29b in den veränderten Eigenschaften dieser VSMCs spielt, sollte hinsichtlich der Zellmotilität untersucht werden.

Durch Wundheilungsversuche zeigte sich, dass eine erhöhte miR-29b-Menge bereits nach 6 h die Schließung der zellfreier Fläche verzögert, eine miR-29b-Inhibierung jedoch diesen Prozess beschleunigt. Auch wenn die Versuche in Serum-haltigem Medium stattfanden und die Schließung des zellfreien Raums daher von Migration und Proliferation abhing, war nach 6 h noch kein Proliferationseffekt zu erwarten. Demnach war der Unterschied nach 6 h ausschließlich auf die Migration zurückzuführen.

Um eindeutigere Aussagen über die Migration treffen zu können, wurden Einzelzell-Trackings durchgeführt, in denen primäre humane VSMCs mit nachweisbar hoher bzw. geringer miR-29b-Konzentration einzeln verfolgt wurden. Als Kontrollen dienten untransfizierte Zellen und solche, die mit Plasmiden ohne miR-29b-Spezifikation (Kontrollplasmide) transfiziert wurden. Verglichen zu beiden Kontrollgruppen wurde die Migration durch miR-29b-Überexpression um 45 % reduziert, wohingegen eine Inhibierung der miR-29b die Migration um 38 % beschleunigte. Diese inverse Korrelation zwischen Migration und miR-29b-Menge erklärt die Effekte der Wundheilungsversuche. Eine vergleichbare Regulation wurde in multiplen Myelomzellen nachgewiesen, wo eine gesteigerte miR-29b ebenfalls die Migration beeinträchtigte ²⁷¹. Ein pro-migratorischer Effekt der miR-29b wurde in human Brustkrebszellen belegt ²⁷². In VSMCs fördert oxLDL die miR-29b-Expression sowie die Migration, wobei der direkte Zusammenhang der zwei Effekte nicht gezeigt wurde ²⁷³. Die miR-29b-abhängige Migration scheint anhand dieser Studien ein komplexer und Zelltyp-spezifischer Prozess zu sein, der nicht vereinheitlicht werden kann. Für VSMCs können wir jedoch klar definieren, dass eine reduzierte miR-29b, wie es durch Aldosteron induziert werden kann, die Migration erhöht und damit zum Remodeling beitragen kann.

Um effizient migrieren zu können ist ein Gleichgewicht aus Anheftung und Ablösen der VSMCs notwendig. Unsere Untersuchungen zur Adhärenz glatter Gefäßmuskelzellen zeigten, dass ein Überschuss an miR-29b die Adhärenz signifikant reduzierte. Unsere Daten stützend, wurde in Nierenzellen durch hohe miR-29b-Mengen Integrin $\beta 1$, ein wichtiges Adhäsionsmolekül, vermindert exprimiert, was potenziell die Anheftung der

Zellen beeinträchtigt²⁵⁵. Eine Inhibierung der miR-29b zeigte in unsere Zellen keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsion, sodass wir schlussfolgern, dass die Adhärenz keinen Einfluss auf Aldosteron-vermittelte Gefäßveränderungen hat und weiterhin auch nicht in die miR-29b-induzierten Unterschiede der Wundheilungsversuche involviert ist. Die Regulation der Zell-Anheftung scheint sich in VSMCs klar von der in Krebszellen zu unterscheiden, wo Zellen mit hoher Adhärenz eine erhöhte Konzentration an miR-29b aufweisen^{271,287}.

4.3.3 MiR-29b reguliert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, lässt die Zellgröße jedoch unbeeinflusst

Im Prozess der Zellvermehrung (Proliferation) ist ein enges Zusammenspiel aus Zellteilung sowie Größen- / Volumenzunahme der Zelle Voraussetzung. Zur näheren Charakterisierung der VSMCs wurden Proliferation sowie Zellgröße als einzelne Parameter, bezüglich ihrer Abhängigkeit von miR-29b, untersucht.

4.3.3.1 Proliferation

Um die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu bestimmen, wurde die Zellzahl nach 0 h (Ausgangswert), 24 h und 48 h mit Hilfe des CASY Zellzählers ermittelt.

Bei den mit miR-29b-Mimic transfizierten A7r5 Zellen zeichnete sich bereits nach 24 h eine signifikant höhere Zellzahl ab verglichen zur Kontrolle. Hier lag die Proliferationsrate 28,3 % (SEM \pm 6,9 %) höher als bei den mit scramble-miR transfizierten Zellen (Abb. 4-29). Nach 48 h waren sowohl bei den Zellen mit miR-29b-Überschuss als auch bei jenen, welche eine geringere miR-29b-Menge aufzeigten, eine signifikant erhöhte Zellzahl messbar. Während die Proliferation von den mit miR-29b-Mimic transfizierten Zellen um 175,4 % (SEM \pm 17,9 %) anstieg, erhöhte sich die Proliferation bei den miR-29b-LNA-Inhibitor-Zellen um 122,0 % (SEM \pm 8,3 %) verglichen zum Ausgangswert (Abb. 4-29).

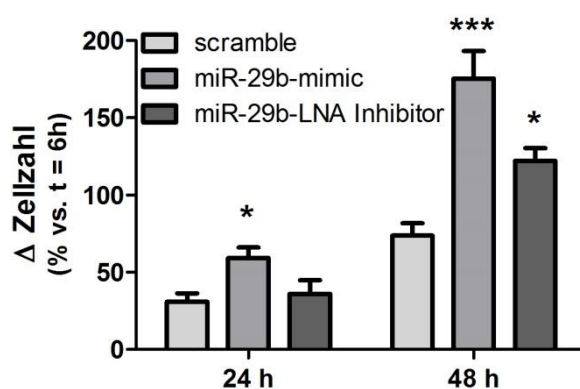


Abbildung 4-29: Ein veränderter Gehalt an miR-29b fördert die Proliferation (publiziert in²⁹³). Die A7r5 Zellen zeigten eine gesteigerte Proliferation sowohl bei Überexpression (24 h und 48 h) als

auch bei Inhibierung der miR-29b (48 h). N = 3-10; n = 9-26

4.3.3.2 Zellgröße

Die Zellgröße wurde durch Ermittlung des mittlere Durchmesser von A7r5 Zellen sowie von HAoSMCs unter Verwendung des CASY Zellzählers ermittelt. Die dargestellten Werte wurden 72 h nach der Transfektion und 48 h nach der Einsaat generiert.

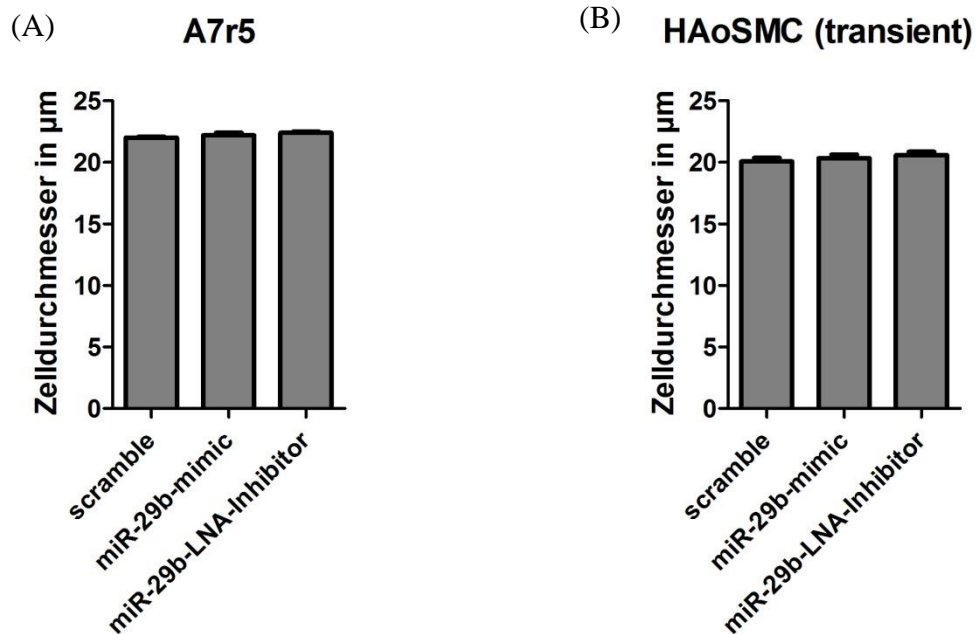


Abbildung 4-30: MiR-29b zeigt keinen Einfluss auf die Zellgröße (publiziert in ²⁹³). Bei den A7r5 Zellen (A) sowie bei den HAoSMCs (B) hatte eine Überexpression bzw. eine Inhibierung der miR-29b nach 48 h keinen Effekt. N = 3-10; n = 9-26

Weder bei den A7r5 Zellen noch bei den HAoSMCs war ein miR-29b-abhängiger Effekt erkennbar. Während die A7r5 Zellen einen Durchmesser zwischen 22,0 µm und 22,4 µm aufwiesen, waren die primären HAoSMC Zellen kleiner. Ihr Durchmesser lag zwischen 20,1 µm und 20,6 µm, unabhängig von der miR-29b-Konzentration. Zusammenfassend kann man sagen, dass miR-29b weder eine Hyper- noch eine Hypotrophie glatter Gefäßmuskelzellen auslöste (Abb. 4-30).

4.3.3.3 Diskussion

Zellproliferation definiert sich zum einem über die Zellteilung, wie auch über eine Zunahme in der Zellgröße, auch Hypertrophie genannt. Eine gesteigerte Proliferation ist ein wichtiges Merkmal dedifferenzierten glatter Gefäßmuskelzellen des sekretorischen

Phänotyps. Deswegen sollte der Einfluss von miR-29b auf das Zellwachstum näher charakterisiert werden.

Eine Überexpression der miR-29b zeigte nach 24 h wie auch nach 48 h eine gesteigerte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. In VSMCs, in welchen miR-29b inhibiert wurde, detektierte man ebenfalls eine erhöhte Proliferation, jedoch erst nach 48 h. Demnach besteht zwischen miR-29b und der VSMC-spezifischen Proliferation ein nicht-linearer Zusammenhang, in dem hohe wie auch geringe miR-29b-Konzentrationen die Zellvermehrung begünstigen. Dieser Gegensatz und die Zeitverzögerung zwischen den miR-29b-Effekten lassen verschiedene intrazelluläre Regulationswege vermuten. Wie aus diversen Krebszelllinien bekannt ist, wirkt miR-29b proliferationshemmend, weswegen diese miR in malignem Gewebe oft stark reduziert ist ^{277,281}. Dabei sind Zellzyklus-steuernde Proteinkinasen, wie CDK6 oder CDK42, Zieltranskripte der miR-29b. Durch eine verminderte Expression von CDK42 und p85 α aktiviert miR-29b p53, einen Tumorsuppressor, welcher an der Kontrolle des Zellzyklus, der Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt ist ^{283,284}. Ein Einfluss von miR-29b auf die Proliferation über die Kontrolle von CDKs wäre auch für unsere Zellen vorstellbar, muss jedoch in weiterführenden Studien belegt werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine reduzierte miR-29b-Menge unter physiologischen Bedingungen die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen langfristig erhöhen und dadurch zu Remodeling-Prozessen im Kreislaufsystem beitragen kann.

Bezüglich der Zellgröße wurde in Mäusen mit pathologischer linksventrikulären Hypertrophie gezeigt, dass unter diesen Bedingungen miR-29b konstant bleibt, während miR-29a und miR-29c reduziert werden ²⁸⁵. Für VSMCs konnten wir bestätigen, dass miR-29b keinen Einfluss auf die Zellgröße hat und ein direkter Zusammenhang zwischen beiden auszuschließen ist.

4.3.4 MiR-29b verschiebt das Verhältnis zwischen Nekrose und Apoptose

Der Zelltod ist ein weiterer wichtiger Parameter, der in Remodeling-Prozesse involviert ist und in zwei Arten unterschieden wird. Während die Nekrose einen pathologischen Zelluntergang darstellt, spricht man bei der Apoptose vom physiologischen oder

programmierten Zelltod. Beide Arten wurden hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von miR-29b untersucht.

4.3.4.1 Nekrose

Als Marker für die Nekrose wurde die Menge an Laktat-Dehydrogenase (LDH) gemessen. Dabei handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes zytoplasmatisches Enzym, was durch seinen Umsatz von NADH verhältnismäßig leicht nachweisbar ist. Geht eine Zelle in die Nekrose, so werden ihre zytoplasmatischen Bestandteile freigesetzt. Der direkte Vergleich zwischen LDH-Aktivität im Zellüberstand und im Zelllysate gibt daher Aufschluss über den Nekrose-Status einer Zelle.

Unter Beachtung, dass Aldosteron eine Verringerung der miR-29b-Menge hervorruft, zeigten unsere Ergebnisse eine gesteigerte LDH-Freisetzung nach Aldosteronstimulation wie auch durch den miR-29b-Inhibitor (Abb. 4-31 A). Durch Aldosteron stieg die LDH-Aktivität um 17,4 % (SEM \pm 9,7 %), durch den Inhibitor um 15,4 % (SEM \pm 6,5 %) signifikant an. In den A7r5 Zellen wie auch in den lentiviral transfizierten HAoSMCs zeigte sich ein leichter, jedoch signifikanter, anti-nekrotischer Effekt bei miR-29b-Überschuss. In den A7r5 Zellen sank das LDH um 12,5 % (SEM \pm 2,7 %) und in den HAoSMCs um 25,3 % (SEM \pm 5,1 %) signifikant ab (Abb. 4-31 A, B).

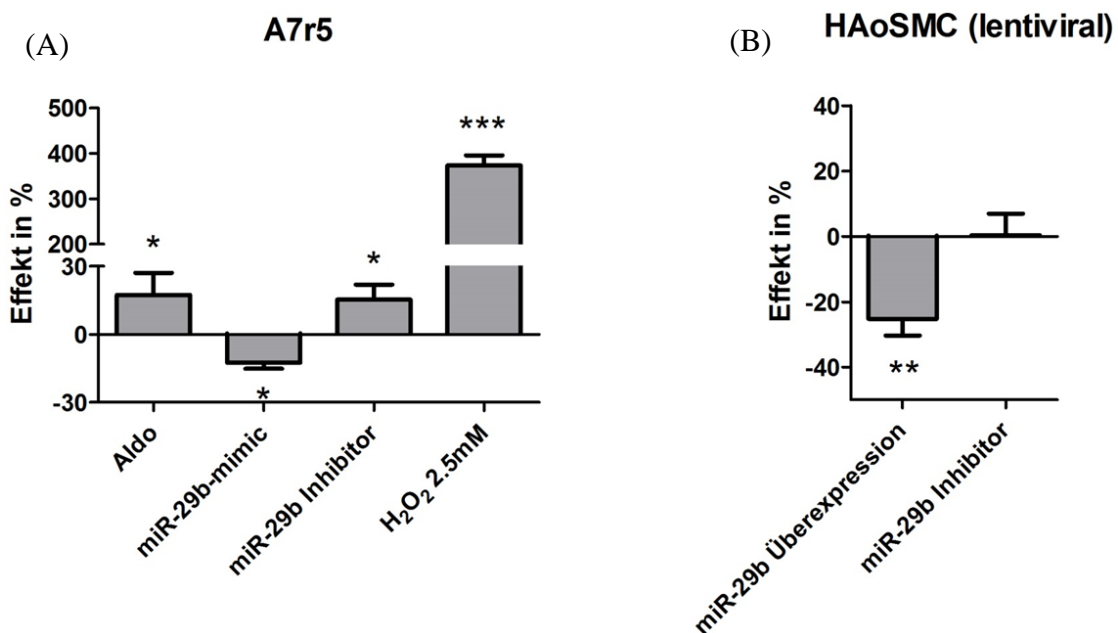


Abbildung 4-31: MiR-29b wirkt leicht anti-nekrotisch in glatten Gefäßmuskelzellen (publiziert in ²⁹³). LDH-Messungen in A7r5 Zellen und HAoSMCs wiesen auf einen leicht anti-nekrotischen Effekt der

miR-29b hin. Während Aldosteron und der miR-29b-Inhibitor in A7r5 Zellen zu einer leichten Erhöhung der LDH-Konzentration führten, zeigte sich eine dezente Verringerung durch miR-29b-Mimic (A). H₂O₂ (2,5 mM) wurde als Positiv-Kontrolle der Nekrose verwendet (A). In den lentiviral transfizierten HAoSMCs zeigte eine Überexpression wie in den A7r5 Zellen einen anti-nekrotischen Effekt, während der Inhibitor keine Veränderung bewirkte (B). N = 4-15; n = 12-69

Der miR-29b-Inhibitor hatte keinen Einfluss auf die Nekrose in HAoSMCs. Als Positiv-Kontrolle wurden A7r5 Zellen mit 2,5 mM Wasserstoffperoxid stimuliert, was eine LDH-Zunahme von 373,6 % (SEM ± 22,2 %) im Zellüberstand zur Folge hatte. Im direkten Vergleich dazu waren die miR-29b-abhängigen Effekte eher gering.

4.3.4.2 Apoptose

Um die Apoptose-Rate diverser Zellen zu beurteilen, wurde die Aktivität von Caspase-3 in den Zelllysaten gemessen.

Durch Überexpression der miR-29b zeigte sich in den A7r5 Zellen und den HAoSMCs ein leichter pro-apoptotischer Effekt (Abb. 4-32 A, B). Dabei stiegen die Werte um 22,4 % (SEM ± 9,8 %) in A7r5 Zellen und in lentiviral transfizierten HAoSMCs um 29,6 % (SEM ± 11,2 %) an. Waren A7r5 Zellen mit Aldosteron stimuliert, so stieg auch die Apoptose moderat an, was vermuten lässt, dass der pro-apoptotische, wenn auch geringe, Aldosteroneffekt über miR-29b-unabhängige Signalwege vermittelt wird. Die Caspase-3-Aktivität stieg in diesem Fall um 17,1 % (SEM ± 11,2 %).

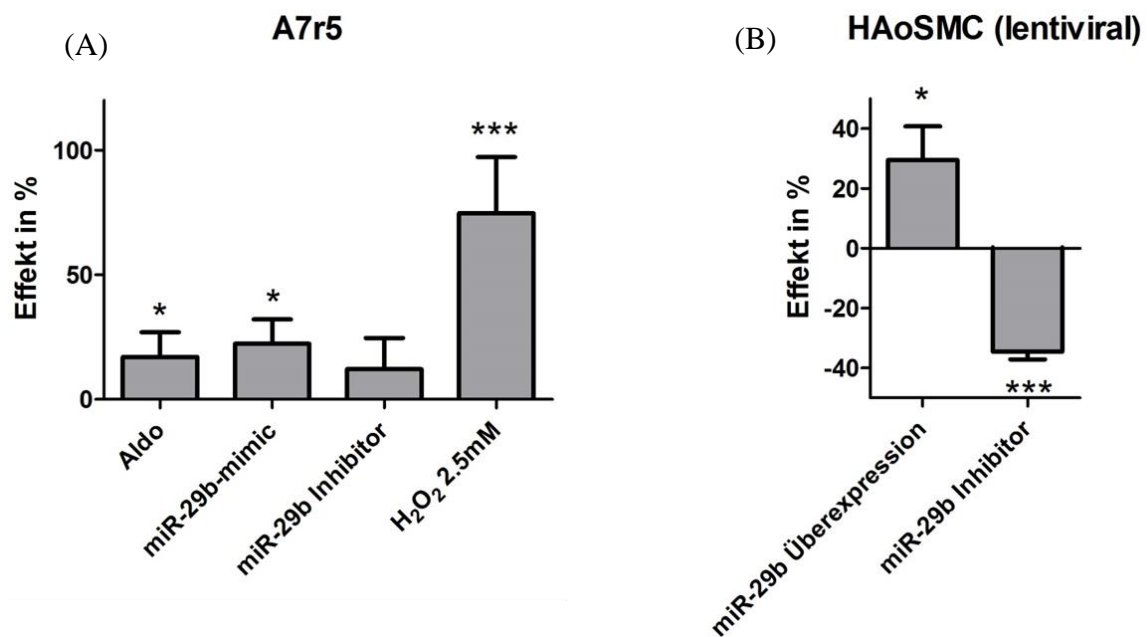


Abbildung 4-32: MiR-29b zeigt einen leicht pro-apoptotischen Effekt in glatten Gefäßmuskelzellen (publiziert in ²⁹³). In A7r5 Zellen führten eine Aldosteronstimulation sowie ein miR-29b-Überschuss zur

geringen, jedoch signifikanten Zunahme an Caspase-3-Aktivität. Eine miR-29b-Inhibierung zeigte keinen Effekt im Gegensatz zu H₂O₂ (2,5 mM), welches als Positiv-Kontrolle der Apoptose eingesetzt wurde (A). Ein ebenfalls dezent pro-apoptotischer miR-29b-Effekt konnte in den lentiviral transfizierten HAoSMCs gezeigt werden, wo die Caspase-3-Aktivität bei miR-29b-Überexpression anstieg und abnahm wenn miR-29b inhibiert wurde (B). N = 4-15; n = 12-66

Ebenso wie bei der Nekrose diente die Inkubation mit 2,5 mM Wasserstoffperoxid als Marker für den Zelltod. Hier zeigte sich eine Steigerung der Apoptose um 74,8 % (SEM ± 22,5 %) verglichen zu Kontrollzellen (Abb. 4-32 A). Wie auch schon bei der Nekrose nahm miR-29b nur moderat Einfluss auf die Apoptose und damit den physiologischen Zelltod.

4.3.4.3 Diskussion

Um zu untersuchen welche Wirkung miR-29b auf den Untergang von VSMCs hat, wurden Nekrose und Apoptose untersucht.

Bei der Nekrose erfolgt eine Schädigung der Zellstrukturen, wodurch Bestandteile des Zytoplasmas freigesetzt werden. Als Folge werden Entzündungszellen angezogen, welche die Inflammation des Gewebes fördern. In den VSMCs konnte belegt werden, dass eine Überexpression an miR-29b die Freisetzung an LDH reduziert und eine Inhibierung der miR-29b in A7r5 Zellen die Nekrose fördert. Aldosteron, welches miR-29b spezifisch reduziert, führte ebenfalls zu erhöhter Nekrose glatter Gefäßmuskelzellen, ein vergleichbarer Effekt der auch durch miR-29b-Inhibierung erreicht wurde. Dennoch waren die Effekte verhältnismäßig klein, da eine H₂O₂-Behandlung ein weitaus höheres Maß an Nekrose induzierte. In der Literatur wurde ein Zusammenhang zwischen miR-29b und Nekrose bislang noch nicht beschrieben.

Die Apoptose ist verglichen zur Nekrose ein programmierter Zelltod, welcher laut Definition das umliegende Gewebe nicht beeinträchtigt und keine Entzündungsprozesse verursacht. Intrazelluläre Proteasen, sogenannte Caspasen, vermitteln diesen gerichteten Zelltod. Caspase-3 vermittelt gezielt die Chromatin-Kondensation wie auch die DNA-Fragmentierung und ist eine ubiquitär und quantitativ häufig vorkommende Caspase, weswegen sie in unseren Versuchen als Apoptose-Marker verwendet wurde^{301,302}. In VSMCs führte eine hohe Konzentration an miR-29b zu einer erhöhten Aktivität von Caspase-3, während eine Inhibierung in den Primärzellen die Apoptose reduzierte. Verglichen zur H₂O₂-Kontrolle zeigte miR-29b demnach einen leichten pro-

apoptotischen Einfluss. Der Apoptose-fördernde Effekt von Aldosteron scheint hingegen nicht durch miR-29b-Reduktion erklärbar zu sein und lässt zusätzliche intrazelluläre Regulationswege vermuten. Der pro-apoptotische Einfluss von miR-29b wurde bereits in verschiedenen Tumorzelllinien beschrieben, wo Onkogene wie Mcl-1, Tcl 1 oder der Transkriptionsfaktor Sp 1 als Zielgene der miR-29b bestätigt wurden. So induziert eine hohe Mcl-1-Expression, wie es durch miR-29b-Reduktion hervorgerufen wird, anti-apoptotische Effekte und trägt so zur Tumorprogression bei. Eine Überexpression der miR-29b in multiplen Myelomzellen hingegen verringert Mcl-1 und wirkt pro-apoptotisch indem es die Caspase-3-Aktivierung fördert^{282,303}. Eine vergleichbare inhibitorische Wirkung zeigt miR-29b bezüglich Tcl 1 in chronischer lymphatischer Leukämie²⁷⁵. Ein weiteres Zielgen von miR-29b ist Sp 1, welches im multiplen Myelom Einfluss auf das Zellüberleben hat und das Zellwachstum begünstigt. Es wurde gezeigt, dass sich miR-29b und Sp 1 gegenseitig regulieren können, wobei eine miR-29b-Überexpression das Zellwachstum inhibiert sowie die Apoptose fördert²⁷¹. Diesen pro-apoptotischen Effekt der miR-29b aus Tumorzellen konnten wir für glatte Gefäßmuskelzellen belegen, wobei involvierte Regulatorproteine für diesen Zelltyp noch nicht charakterisiert wurden.

Hinsichtlich ihrer Wirkung auf Nekrose und Apoptose, zeigte miR-29b eine Janusköpfige Regulation. Durch eine verringerte miR-29b-Expression, wie sie durch pathologische Aldosteronkonzentrationen erreicht wird, begünstigt man die Nekrose wohingegen die Apoptose verringert wird. Auch wenn die Quantität der Effekte vergleichsweise gering ist, könnte eine Verschiebung des Nekrose-Apoptose-Gleichgewichts zugunsten der Nekrose zur pathologischen Aldosteronwirkung in Gefäßen beitragen indem ein pro-inflammatorisches Milieu begünstigt wird. Wie durch Ma et al. beschrieben wurde, sind die Transkripte von Interferon γ und Interleukin-8 direkte Zielgene von miR-29b, was die These einer entzündungshemmenden und anti-nekrotischen Wirkung der miR-29b stützt^{271,288}.

4.3.5 Zusammenfassung des miR-29b-Einflusses auf den Phänotyp-Wechsel glatter Gefäßmuskelzellen

Der Phänotyp-Wechsel (*phenotypic switch*) glatter Gefäßmuskelzellen von kontraktile zu sekretorisch ist ein Prozess, der vor allem während vaskulärer Remodeling-Prozessen

auftritt. Es ist bekannt, dass verschiedene miRs darauf Einfluss nehmen können. Am besten beschrieben ist dabei das miR-143/145-Cluster. Ein Defizit beider miRs begünstigt den sekretorischen Phänotyp von VSMCs sowie den Verlust der Kontraktionsfähigkeit. Ein reduzierter Blutdruck sowie eine gestörte Antwort auf Gefäßverletzungen konnte in Mäusen mit miR-143/145-Doppelmutation nachgewiesen werden ^{219,220}. Die Identifizierung von miR-29b, als Aldosteron-regulierte miR, hat daher das Potenzial die pathologischen Effekte von MR/Aldosteron im Gefäßsystem näher aufzuklären. Aufgrund dessen sollte der Einfluss von miR-29b in VSMCs bezüglich verschiedener Remodeling-Parameter untersucht werden.

Es konnte belegt werden, dass eine verringerte miR-29b-Konzentration den sekretorischen Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen fördert, indem vermehrt extrazelluläre Matrix gebildet, die Migration beschleunigt, die Proliferation erhöht sowie das Verhältnis zwischen Nekrose und Apoptose zugunsten der Nekrose verschoben wird (Abb. 4-33). Die Zelladhärenz und die Zellgröße scheinen durch geringe miR-29b-Konzentrationen unbeeinflusst zu sein.

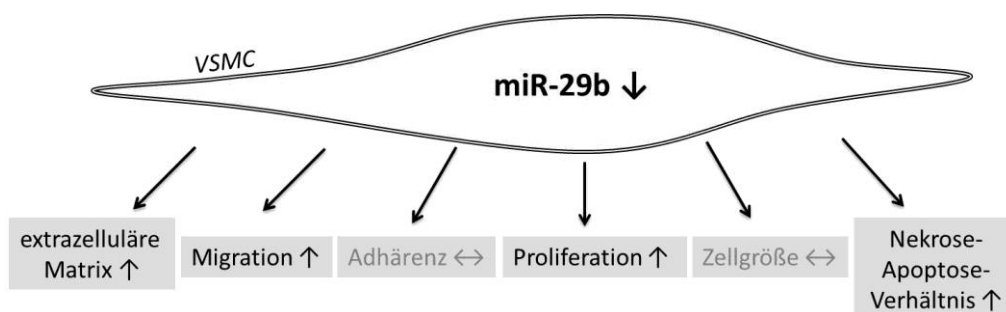


Abbildung 4-33: Geringe miR-29b-Mengen begünstigen den sekretorischen Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen.

Durch die Dedifferenzierung glatter Gefäßmuskelzellen verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Kontraktion. Sekretorische VSMCs fördern zudem das Remodeling von Gefäßen. Reduzierte miR-29b-Konzentrationen wurden auch in undifferenzierten skeletalen Muskelzellen nachgewiesen, in welchen TGF- β eine Differenzierung verhindert ²⁸⁶. In Osteoblasten fördert miR-29b ebenfalls den differenzierten Phänotyp indem es anti-osteogene Faktoren inhibiert und die Produktion extrazellulärer Matrix verhindert ²⁶⁰. MiR-29b begünstigt demnach die Differenzierung verschiedener Zelltypen, ein Effekt, den wir für VSMCs bestätigen konnten.

4.4 Aldosteron steigert die Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch Reduktion der miR-29b

Um zu klären, ob die durch Aldosteron ausgelösten pathologischen Prozesse tatsächlich über miR-29b vermittelt werden, wurden erneut Einzelzell-Migrationsexperimente durchgeführt. Für diese Versuche wurden HAoSMCs verwendet, welche mit 250 Viren pro Zelle transfiziert wurden. Es galt zu klären, welchen Effekt Aldosteron auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen hat und welche Rolle eine konstant hohe bzw. geringe miR-29b-Menge dabei spielt.

4.4.1 Aldosteron beschleunigt die Migration

Die HAoSMCs wurden bereits 24 h vor und während der Messung mit 10 nM Aldosteron stimuliert. Es zeigte sich, dass durch die Stimulation die Migration untransfizierter Kontrollzellen signifikant erhöht wurde. Während HAoSMCs, die mit DMSO als Kontrolle inkubiert wurden, durchschnittlich 169,2 μm (SEM \pm 5,0 μm) in 4 h zurück legten, migrierten Aldosteron-stimulierte Zellen 230,9 μm (SEM \pm 6,4 μm) im gleichen Zeitfenster. Das entsprach einer zusätzlichen Wegstrecke von 61,7 μm und damit einer Erhöhung um 36,5 % (Abb. 4-37). Damit wurde durch Aldosteron ein vergleichbarer Effekt erzielt, wie durch eine Inhibierung der miR-29b.

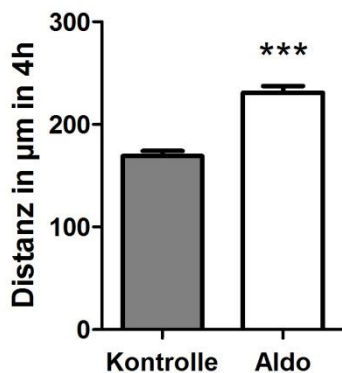


Abbildung 4-34: Die Migration von VSMCs wird durch Aldosteron erhöht (publiziert in ²⁹³). Durch Einzelzell-Tracking-Analysen wurde gemessen, dass die Kontrollzellen innerhalb von 4 h 169,2 μm migrierten. Zellen welche mit 10 nM Aldosteron stimuliert wurden, erreichten 230,9 μm und waren damit signifikant schneller. N = 12; n = 108-129

4.4.2 Die Wirkung von Aldosteron wird durch Konstanthalten der miR-29b aufgehoben

Der Effekt von Aldosteron wurde ebenso an lentiviral transfizierten HAoSMCs gemessen, welche kontinuierlich hohe bzw. geringe Mengen an miR-29b exprimierten.

Diese Untersuchungen ergaben, dass Überexpression bzw. Inhibierung der miR-29b den stimulierenden Aldostereffekt hinsichtlich der Zellmigration aufhoben. Die Wegstrecke binnen 4 h betrug bei den Zellen, die miR-29b überexprimierten, 113,7 μm (SEM \pm 12,4 μm) unter Kontrollbedingungen und 131,0 μm (SEM \pm 8,9 μm) bei Aldosteron-stimulierten Zellen, was sich nicht signifikant unterschied (Abb. 4-38 A). Ebenfalls kein Aldostereffekt war bei Zellen mit miR-29b-Inhibierung erkennbar. Während diese HAoSMCs unter DMSO-Inkubation (1 : 1000) durchschnittlich 264,1 μm (SEM \pm 13,5 μm) migrierten, wurde bei Aldosteron-stimulierten Zellen, welche eine verringerte miR-29b-Menge aufwiesen, nur eine Erhöhung um 24,7 μm (SEM \pm 17,4 μm) erreicht (Abb. 4-38 A).

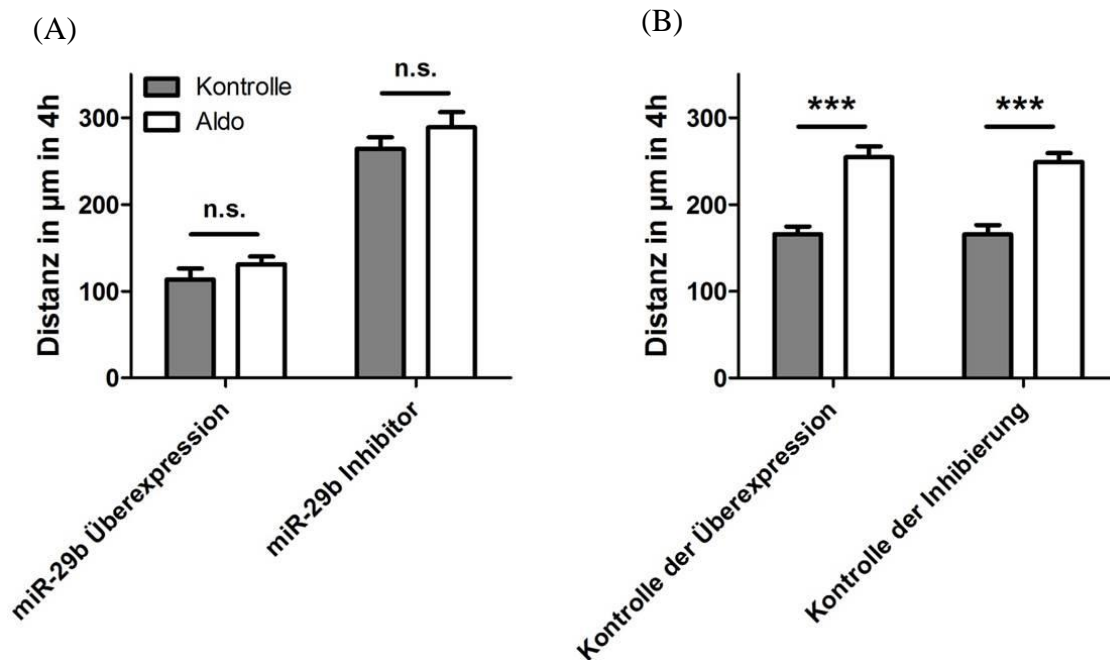


Abbildung 4-35: Aldosteronwirkung auf die Migration spezifisch transfizierter HAoSMCs (publiziert in ²⁹³). Der migrationsfördernde Effekt von Aldosteron wird durch ein Klemmen der miR-29b auf hohem bzw. niedrigem Niveau aufgehoben (A). Die Zellen hingegen, welche zur Kontrolle ohne miR-29b-Spezifikation transfiziert wurden, zeigten eine erhöhte Migration nach Aldosteronstimulation (B). N = 3, n = 25-36

Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, welche mit Plasmiden ohne miR-29b-Spezifikation transfiziert wurden, eine deutliche Antwort auf Aldosteron. In beiden Kontrollen erhöhte das Steroidhormon die Migration signifikant um 53,7 % bzw. 50,5 % (Abb. 4-38 B). Aus diesem Datensatz ließ sich erkennen, dass die Aldosteron-induzierte Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch miR-29b vermittelt wird.

4.4.3 Diskussion

Das Steroidhormon Aldosteron ist ein bekannter Mediator von Remodeling-Prozessen im Herz-Kreislaufsystem. Es wurde im Menschen gezeigt, dass hohe Aldosteronkonzentrationen zu Herzhypertrophie sowie interstitieller Herzfibrose führen^{115,116}. Weiterhin konnte ein durch Aldosteron induziertes Remodeling im Rattenherzen sowie Gefäßverdickungen und Entzündung durch Gabe von Spironolaktone, einem MR-Antagonisten, verhindert werden^{118,119}. Während dieser Prozesse nimmt Aldosteron unter anderem Einfluss auf die Kollagenbildung, Inflammation, oxidativen Stress sowie die Zellmotilität. So steigert Aldosteron sowohl über Expression von Osteopontin wie auch durch Regulation von RhoA und Rho-assoziiierter Kinasen die Migration glatter Gefäßmuskelzellen^{304,305}. Eine durch Aldosteron gesteigerte Migration um 36,5 % konnten wir in human primären VSMCs (HAoSMCs) bestätigen, wodurch das Steroidhormon potenziell das Remodeling in humanen Gefäßen begünstigt. Dieser stabil nachzuweisende Effekt war Grundlage für Untersuchungen, die klären sollten, ob Aldosteron die gesteigerte Motilität über eine miR-29b-Reduktion vermittelt. Dazu wurden HAoSMCs lentiviral transfiziert, sodass die endogene miR-29b auf konstant hohen (4,4-fach) bzw. konstant geringem Niveau (-10,1-fach) fixiert wurde. In beiden Fällen bewirkte eine Aldosteronstimulation keine gesteigerte Migration der VSMCs, wie sie unter Kontrollbedingungen nachzuweisen war. Betrachtet man die Daten der miR-29b-Inhibierung sind jedoch zwei Fälle möglich. Zum einen ist es denkbar, dass Aldosteron aufgrund des geringen miR-29b-Spiegels nicht mehr wirken konnte. Zweitens könnten die Zellen bereits ihr Migrationslimit erreicht haben, wodurch ein möglicher Aldosteroneffekt ebenfalls nicht sichtbar wäre.

Aus den gewonnenen Daten wird geschlussfolgert, dass die Konzentrationen an miR-29b so hoch bzw. gering waren, dass Aldosteron diese spezielle miR nicht mehr regulieren konnte und darüber keinen Einfluss mehr auf die Migration hatte. Demnach ist bewiesen, dass Aldosteron eine gesteigerte VSMC-Migration über eine Reduktion der endogenen miR-29b bewirkt (Abb. 4-39).



Abbildung 4-36: Aldosteron bewirkt eine gesteigerte Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch Reduktion der miR-29b.

4.5 Erreichte Transfektionsmengen an miR-29b

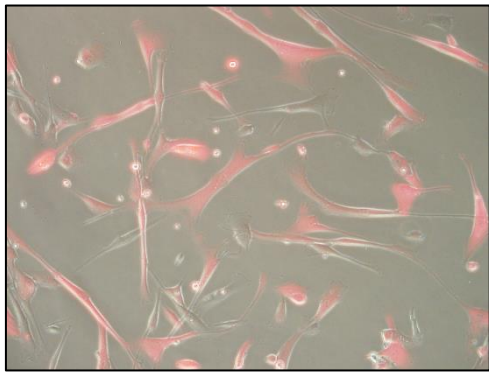
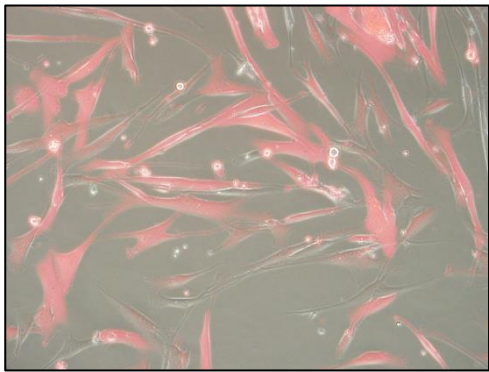
4.5.1 ...in primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HAoSMC)

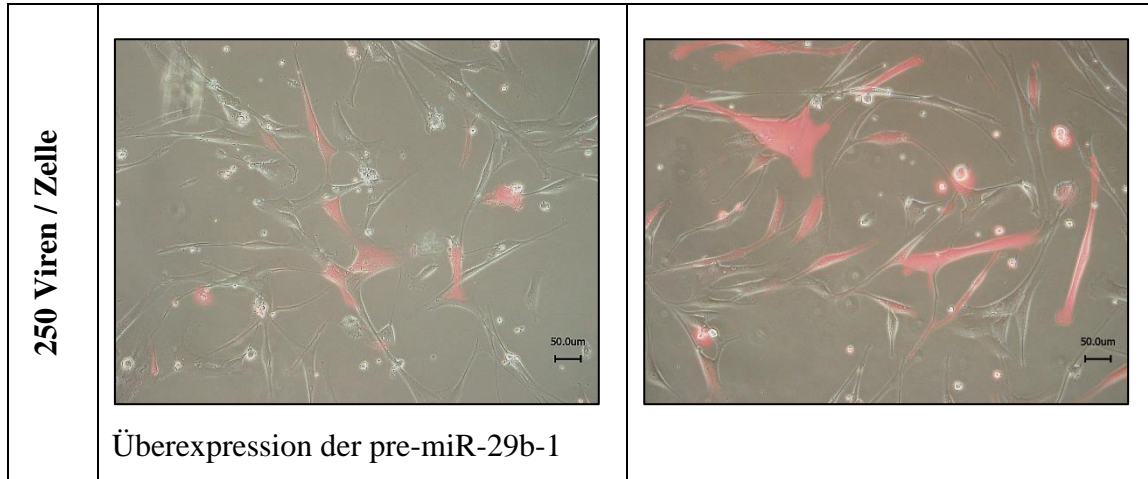
Um Versuche nachzustellen, die so nah wie möglich humane physiologische Bedingungen widerspiegeln, ist die Verwendung primärer Zellen unumgänglich. Der Nachteil gegenüber etablierten Zelllinien liegt allerdings in der schwierigen Handhabung und einer schlechten Transfizierbarkeit. Aufgrund dessen wurden die primären humanen aortalen glatten Gefäßmuskelzellen zum einen lentiviral und als weiterer Ansatz mit einem Lipofektion-Transfektionsreagenz transfiziert (Fugene HD von Promega).

Lentivirale Transfektion

In der lentiviralen Transfektion wurde ein roter Fluoreszenzfarbstoff (Crimson) als Kontrolle verwendet, wodurch man transfizierte Zellen leicht bestimmen und quantifizieren konnte (Tab. 4-3). Die Transfektionseffizienz betrug im ersten Transfektionsansatz mit 200 MOI z 80 - 90 %, erkennbar an den rot leuchtenden Zellen. Im zweiten Ansatz mit 250 MOI waren im Vergleich lediglich 30 – 60 % der Zellen transfiziert (Tab. 4-3). Auf die quantifizierte Vitalität und Morphologie der Zellen hatte die Transfektion mittels Lentivirus keinen Einfluss.

Tabelle 4-3: Lentivirale Transfektion primärer aortaler, glatter Gefäßmuskelzellen (HAoSMC). Bei der Transfektion von 200 Viren / Zelle wurden hohe Effizienzen von 80 – 90 % an transfizierten Zellen gemessen. Wurden 250 Viren / Zelle transfiziert, erreichte man wesentlich geringere Ausbeuten an transfizierten HAoSMCs. Eichskala = 50 µm

	miR-29b Überexpression	miR-29b Inhibierung
200 Viren / Zelle	 <p>Überexpression der reifen miR-29b</p>	



Sobald eine stabile Transfektion erreicht war, wurde über mehrere Passagen RNA isoliert und die miR-29b- sowie die U6 snRNA-Menge als Kontrolle durch TaqMan qPCR quantifiziert. Die erreichten Expressionsniveaus an miR-29b nach Überexpression bzw. Inhibierung sind im Folgenden dargestellt.

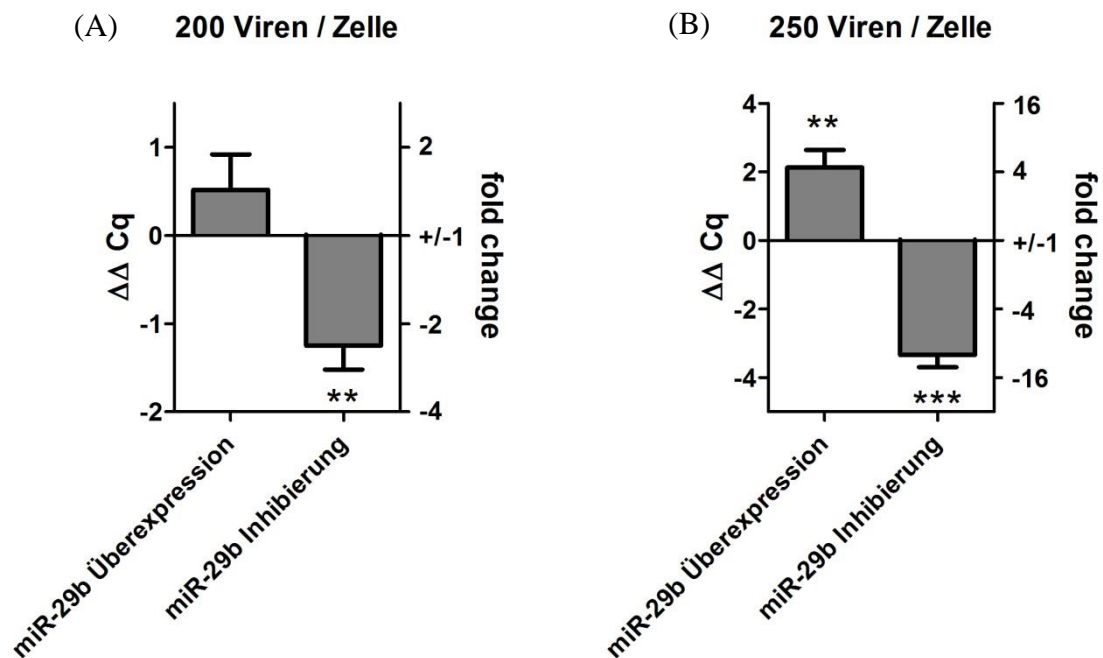


Abbildung 4-37: Erreichter Transfektionsgehalt an miR-29b in lentiviral transfizierten HAoSMCs. Aus beiden Abbildungen ist ersichtlich, dass eine Überexpression der miR-29b durch Klonierung der reifen miR-29b (A) sowie auch der pre-miR-29b1 (B) zu einem Anstieg der endogenen miR-29b-Menge führte. Eine Inhibierung oder Abnahme der miR-29b-Menge wurde durch Transfektion eines *Decoy*-Plasmids erreicht. Je mehr Viren pro Zelle zur Transfektion eingesetzt wurden, desto stärker war die Überexpression bzw. die Inhibierung der miR-29b. N = 4-5, n = 5-7

Im ersten Transfektionsdurchgang mit 200 Viren pro Zelle wurde mithilfe der Überexpression das 1,44-fache ($\Delta\Delta Cq = 0,52$; $SEM \pm 0,4$) des miR-29b-Gehalts erreicht, verglichen zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu führte die Inhibierung mittels *Decoy*-Plasmid zu einer Reduktion der miR-29b-Menge um das 2,38-fache ($\Delta\Delta Cq = -1,25$; $SEM \pm 0,37$) (Abb. 4-34 A). Wesentlich höhere Effekte konnten im zweiten Transfektionsansatz nachgewiesen werden. So erzielte man durch Überexpression der pre-miR-29b und 250 Viren pro Zelle eine Erhöhung der miR-29b-Konzentration um das 4,37-fache ($\Delta\Delta Cq = 2,13$; $SEM \pm 0,51$). Durch den Einsatz des höheren Virentiters verringerte sich die Menge an miR-29b mittels Inhibierung um das 10,1-fache ($\Delta\Delta Cq = -3,34$; $SEM \pm 0,36$) (Abb. 4-34 B).

Transiente Transfektion

Unter Verwendung eines Lipofektion-Transfektionsreagenzes (Fugene HD von Promega) konnten die primären glatten Gefäßmuskelzellen erfolgreich transfiziert werden. Durch 10 nM miR-29b-Mimic wurde der miR-29b-Gehalt auf das 19,1-fache ($\Delta\Delta Cq = 4,25$; $SEM \pm 0,17$) erhöht. Der miR-29b-LNA-Inhibitor (10 nM) verringerte die Menge an endogener miR-29b um das 13,2-fache ($\Delta\Delta Cq = -3,72$; $SEM \pm 0,37$) (Abb.3-35).

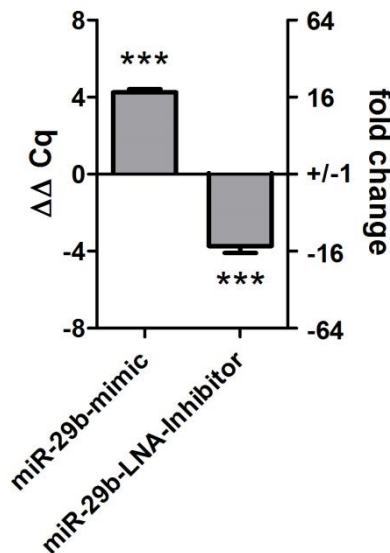


Abbildung 4-38: Erreichter Gehalt an miR-29b durch Transfektion mit Fugene HD in HAoSMCs. Durch die Überexpression der miR-29b durch Mimic wurden Konzentrationen vom 19,1-fachen (10 nM) der Kontrolle erreicht. Der miR-29b-LNA-Inhibitor senkte die miR-29b-Menge auf das 13,2-fache (10 nM) signifikant ab. N = 5; n = 5-7

4.5.2 ... in immortalisierten A7r5 Zellen

Bei den A7r5 Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Ziellinie glatter Gefäßmuskelzellen aus der Aorta der Ratte. Die transiente Transfektion erfolgte mit Fugene HD von Promega.

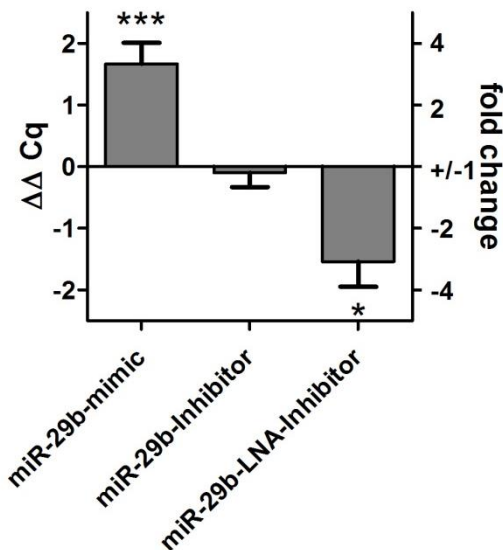


Abbildung 4-39: Erreichter Gehalt an miR-29b durch Transfektion mit Fugene HD in A7r5 Zellen.

Unter Nutzung von 30 nM miR-29b-Mimic wurde eine 3,2-fache Überexpression der miR-29b erreicht. Der antisense-Inhibitor (30 nM) zeigte keine signifikante Reduktion der miR-29b-Menge, wohingegen der LNA-Inhibitor den miR-29b-Gehalt um das 2,91-fache reduzierte. N = 3, n = 8-9

Für die Überexpression sowie auch für die Inhibierung wurden je 30 nM der Oligonukleotide eingesetzt. Durch miR-29b-Mimic erreichte man das 3,19-fache ($\Delta\Delta Cq = 1,67$; SEM $\pm 0,34$) der endogenen Menge unter Kontrollbedingungen. Durch Einsatz des antisense-Inhibitors erreichte man keine signifikante Reduktion der miR-29b-Konzentration in A7r5 Zellen. Unter Einsatz eines LNA-Inhibitors konnte der miR-29b-Gehalt hingegen um das 2,91-fache ($\Delta\Delta Cq = -1,54$; SEM $\pm 0,41$) vermindert werden (Abb. 4-36).

4.5.3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde sowohl die lentivirale wie auch die transiente Zelltransfektion angewendet um verschiedene Mengen an miR-29b in den unterschiedlichen Zellen zu erreichen. Bei der lentiviralen Transfektion von HAoSMCs wurde durch Transfektion von 200 Viren / Zelle eine miR-29b-Regulation von 1,4- bzw. -2,3-fach erreicht, Werte, wie sie auch unter physiologischen Bedingungen erreicht werden, z.B. durch Aldosteron, welches miR-29b um das 1,5-fache reduziert. Die Daten zur extrazellulären Matrix-Synthese, die Migrationsversuche mittels Einzelzell-Tracking sowie die Analysen zum Zelltod spiegeln daher sehr wahrscheinlich den physiologischen Zustand in VSMCs wider. Konstante, deutlich höhere bzw. geringere Konzentrationen an miR-29b, wie sie im 2. Durchgang erreicht wurden (4-fach bzw. -10-fach), eigneten sich für

Versuche, in denen die miR-29b-Konzentration konstant auf einem hohen bzw. niedrigen Niveau fixiert werden sollte. Aldosteron konnte so keine Wirkung mehr auf miR-29b vermitteln, was für unsere weiterführenden Migrationsanalysen von Nutzen war. Ein großer Vorteil der lentiviralen, verglichen zur transienten, Transfektion liegt in der präzisen Identifizierung transfizierter Zellen. Zusammen mit den miRs / *Decoys* wird ein roter Fluoreszenzfarbstoff exprimiert, welcher transfizierte Zellen eindeutig bestimmen lässt. In der transienten Transfektion hingegen sind lediglich Populationsstudien möglich.

Durch die transiente Transfektion von A7r5 Zellen wurden, wie auch durch die lentivirale Transfektion des 1. Durchgangs der Primärzellen, vergleichbare Mengen an miR-29b erreicht. Aus den eingesetzten Transfektionsmengen und den erreichten miR-Spiegeln lässt sich schließen, dass miR-29b eine höchst abundante miR in diesen glatten Gefäßmuskelzellen zu sein scheint. Aufgrund der Regulation im 3,2 bzw. -2,9-fachen Bereich sind die in A7r5 Zellen durchgeführten Versuche gut vergleichbar mit den erreichten Aldosteroneffekten auf miR-29b und erlauben Rückschlüsse auf die pathophysiologische Rolle des Steroidhormons in Gefäßmuskelzellen. Im Falle des antisense-Inhibitors in A7r5 Zellen ist es wahrscheinlich, dass dieser zu einem *Silencing* der miR führt und nicht zum Abbau, da ein miR-Nachweis immer noch möglich war. Die Daten aus den Luciferase-Reporter-Assays bestätigten jedoch seine Wirksamkeit. Weitaus höhere bzw. geringere Konzentrationen an miR-29b wurden durch die transiente Transfektion in HAoSMCs erreicht (-13- bzw. 19-fache Veränderung des endogenen Gehalts). Sie wurden in der Zellgrößenbestimmung eingesetzt und zeigten trotz der großen Differenz zur physiologischen miR-29b-Konzentration keinen Einfluss.

5 Zusammenfassung und Bedeutung

Ein durch das endogene Steroidhormon Aldosteron aktivierter Mineralokortikoid-Rezeptors (MR) stellt ein wichtiges Regulatorsystem der Salz- und Wasserhomöostase und damit des Blutdrucks im menschlichen Körper dar. Ein überaktiver MR bzw. eine erhöhte Aldosteronkonzentration können darüber hinaus zu pathologischen Remodeling-Effekten in Gefäßen führen. Klassischerweise wirkt der aktivierte MR als Transkriptionsfaktor an Hormon-responsiven Elementen (HREs) seiner Zielgene. Der nah verwandte Glukokortikoid-Rezeptor (GR) kann ebenfalls an diese Elemente binden, ohne pathologische Gefäßveränderungen zu bewirken, sodass zusätzliche MR-Signalwege postuliert werden müssen.

Als einen möglichen molekularen Mechanismus für pathologische MR-Wirkungen untersuchten wir die Expression von microRNAs (miRs). MiRs sind kleine endogene RNA-Moleküle, welche die Genexpression post-transkriptionell beeinflussen können und deren kritische Rolle in Herz-Kreislauf-Erkrankungen bereits beschrieben wurde. Daher stellen sie potenzielle Regulatoren dar, welche die pathologischen MR / Aldosteroneffekte erklären könnten.

Durch diese Arbeit konnte miR-29b als eine durch aktivierten MR verringert vorkommende miR in glatten Gefäßmuskelzellen in Kultur und *in vivo*, jedoch nicht in Endothelzellen, identifiziert werden. Dieser Effekt war ausschließlich im Zytosol, nicht aber im Nukleus, detektierbar. Die Tatsache, dass die Konzentrationen der zwei primären miR-29-Transkripte, sowie die der beiden weiteren miR-29-Familienmitglieder, miR-29a und miR-29c, durch Aldosteron unverändert blieben, führt zu der Schlussfolgerung, dass der MR keinen direkten Einfluss auf die Transkription der miR-29b hatte. Weiterhin konnte durch Versuche mit einem Blocker der RNA-Neusynthese (Actinomycin D) eine nicht-genomische MR-Wirkung auf die Reifung der miR-29b ausgeschlossen werden. Einzig eine Aldosteroninkubation vor RNA-Neusynthese-Hemmung zeigte einen spezifischen Abbau der reifen miR-29b und lässt schließen, dass der MR die miR-29b-Stabilität negativ beeinflusst. Wir vermuten, dass die Expression eines miR-Stabilisierungs- oder -Abbauproteins reguliert wurde, wodurch die Stabilität der reifen miR-29b selektiv abnahm. Eine durch Aldosteron verringerte Konzentration

an Vorläufer-miRs (pre-miRs) ließe sich dann durch eine Verschiebung des Fließgleichgewichts zwischen reifer miR und pre-miR erklären (Abb. 5-1).

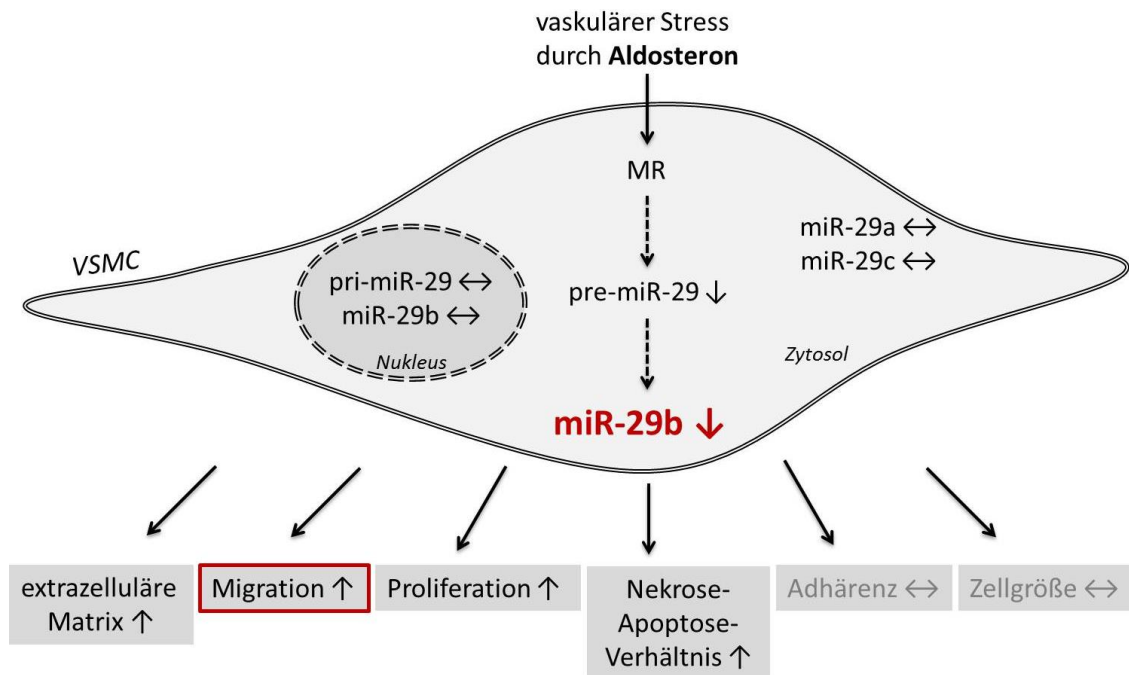


Abbildung 5-1: Zusammenfassung der neuen Erkenntnisse. Pathologische MR-Aktivierung (10 nM Aldosteron) bewirkt eine Reduktion der reifen miR-29b im Zytol glatter Gefäßmuskelzellen, jedoch nicht im Nucleus. Während die primären Transkripte unbeeinflusst sind, zeigen auch pre-miR-29b-1 und -2 eine Aldosteron-abhängige Verringerung. Die beiden weiteren Mitglieder der miR-29-Familie, miR-29a und miR-29c, sind hingegen unabhängig von Aldosteron. Eine reduzierte miR-29b-Menge begünstigt den *phenotypic switch* glatter Gefäßmuskelzellen, indem es die Bildung extrazellulärer Matrix begünstigt, die Migration sowie die Proliferation erhöht und das Verhältnis von Apoptose und Nekrose zugunsten des parainflammatorischen Milieus verschiebt. Auf die Zelladhärenz und die Zellgröße von VSMCs haben reduzierte miR-29b-Konzentrationen keinen Einfluss.

Des Weiteren wurde die Rolle von miR-29b im *phenotypic switch* glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. Eine verringerte miR-29b-Menge verursachte dabei eine vermehrte Bildung an extrazellulärer Matrix. Insbesondere die Zunahme von Kollagen III und IV, welche in der Basalmembran und dem anschließendem Bindegewebe (Lamina fibroreticularis) von Gefäßen vorkommen, wurde in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen. Neben der allgemein gesteigerten Fibrosierung der Gefäßwand, würde eine Verdickung der Basalmembran die Kommunikation zwischen Endothel und tieferen Zellschichten abschwächen und so zusätzlich zum Remodeling beitragen. Weiterhin wurde durch eine reduzierte miR-29b-Konzentration, wie es Aldosteron bewirkte, die Migration und die Proliferation gesteigert, beides Merkmale des undifferenzierten Phänotyps glatter Gefäßmuskelzellen. Zudem begünstigte ein geringer miR-29b-Gehalt ein pro-entzündliches Zellmilieu, da es das Verhältnis zwischen

Nekrose und Apoptose zugunsten des ungerichteten Zelltods verschob. Durch nekrotische Zellen werden verschiedene Entzündungszellen angezogen, welche durch die Ausschüttung von Zytokinen eine Inflammation und letztendlich vaskuläres Remodeling fördern. Zelladhärenz sowie Zellhypertrophie sind ebenfalls im Zusammenhang mit pathologischen Gefäßveränderungen bekannt, waren jedoch durch geringe miR-29b-Mengen unbeeinflusst.

Unsere Migrationsanalysen lassen auf einen Zusammenhang zwischen erhöhter MR-Aktivierung, miR-29b und vaskulärem Remodeling schließen. Dabei konnte Aldosteron die Migration glatter Gefäßmuskelzellen nur steigern, wenn es die endogene miR-29b reduzieren konnte. MiR-29b ist demnach zumindest teilweise in die pathologischen vaskulären Remodeling-Effekte von Aldosteron involviert. Durch diese Erkenntnisse erlangt miR-29b eine zentrale Bedeutung in der Aldosteron-induzierten Entstehung von Gefäßerkrankungen und hat das Potenzial als Therapeutikum Anwendung zu finden.

Anhang

Literaturverzeichnis

1. World Health Organization Europe. *The European health report 2012 : charting the way to well-being*. (WHO Regional Office for Europe, 2012).
2. Go, A. S. *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **127**, 143–52 (2013).
3. Joseph Loscanzo, Mark A. Creager, V. J. D. *Vascular Medicine*. (Little, Brown and Company, 1996).
4. Spornitz, U. M. *Anatomie und Physiologie*. (Springer-Verlag, 1996).
5. Becher, U. M., Endtmann, C., Tiyerili, V., Nickenig, G. & Werner, N. Endothelial damage and regeneration: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Curr. Hypertens. Rep.* **13**, 86–92 (2011).
6. Sena, C. M., Pereira, A. M. & Seiça, R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 2216–31 (2013).
7. Stratman, A. N. & Davis, G. E. Endothelial Cell-Pericyte Interactions Stimulate Basement Membrane Matrix Assembly. *Microsc. Microanal.* **18**, 68–80 (2012).
8. Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **75**, 487–517 (1995).
9. Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol. Rev.* **84**, 767–801 (2004).
10. Langille, B. L. Remodeling of Developing and Mature Arteries: Endothelium, Smooth Muscle, and Matrix. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21**, S11–S17 (1993).
11. Cowan, D. G. & Langille, B. L. Cellular and molecular biology of vascular remodeling. *Curr. Opin. Lipidol.* **7**, 94–100 (1996).
12. Whitley, G. S. J. & Cartwright, J. E. Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta* **31**, 465–74 (2010).
13. Mulvany, M. J. Determinants of Vascular Structure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **19**, S1–S6 (1992).

14. Naftilan, A. RAAS in remodeling and SMC growth. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **3**, 218–227 (1994).
15. Gustafsson, F., Azizi, M., Bauersachs, J., Jaisser, F. & Rossignol, P. Targeting the aldosterone pathway in cardiovascular disease. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **26**, 135–45 (2012).
16. Gimbrone, M. a & García-Cardena, G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc. Pathol.* **22**, 9–15 (2013).
17. Heusch, G. *et al.* Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet* **6736**, 1–11 (2014).
18. Gomez, D. & Owens, G. K. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **95**, 156–64 (2012).
19. Lemarié, C. a, Tharaux, P.-L. & Lehoux, S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 433–9 (2010).
20. Kawai-Kowase, K. & Owens, G. K. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C59–69 (2007).
21. Lim, S. & Park, S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* **47**, 1–7 (2014).
22. Orlandi, A., Bochaton-Piallat, M.-L., Gabbiani, G. & Spagnoli, L. G. Aging, smooth muscle cells and vascular pathobiology: implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* **188**, 221–30 (2006).
23. Berliner, J. a, Leitinger, N. & Tsimikas, S. The role of oxidized phospholipids in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S207–12 (2009).
24. Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. & Michel, J.-B. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc. Res.* **95**, 194–204 (2012).
25. Boyle, J. J., Weissberg, P. L. & Bennett, M. R. Tumor necrosis factor- α promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1553–8 (2003).
26. Bennett, M., Yu, H. & Clarke, M. Signalling from dead cells drives inflammation and vessel remodelling. *Vascul. Pharmacol.* **56**, 187–92 (2012).
27. Kher, N. & Marsh, J. D. Pathobiology of atherosclerosis--a brief review. *Semin. Thromb. Hemost.* **30**, 665–72 (2004).

28. Libby, P., Ridker, P. M. & Hansson, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**, 317–25 (2011).
29. Frostegård, J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med.* **11**, 117 (2013).
30. Beato, M. Gene Regulation by Steroid Hormones. *Cell* **56**, 335–344 (1989).
31. Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889–95 (1988).
32. Chambon, P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1418–28 (2005).
33. Evans, R. M. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1429–38 (2005).
34. Stockand, J. D. New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**, F559–76 (2002).
35. Rocha, R. & Stier, C. T. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 308–14 (2001).
36. McCurley, A., McGraw, A., Pruthi, D. & Jaffe, I. Z. Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors: role in vascular function and contribution to cardiovascular disease. *Pflugers Arch.* **465**, 1661–70 (2013).
37. Morrison, N., Harrap, S. B., Arriza, J. L., Boyd, E. & Connor, J. M. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum. Genet.* **85**, 130–2 (1990).
38. Farman, N. & Rafestin-Oblin, M. E. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **280**, F181–92 (2001).
39. Fuse, H., Kitagawa, H. & Kato, S. Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Mol. Endocrinol.* **14**, 889–99 (2000).
40. Pascual-Le Tallec, L. *et al.* The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1158–69 (2005).
41. Obradović, D. *et al.* 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? *Mol. Pharmacol.* **65**, 761–9 (2004).

42. Kitagawa, H., Yanagisawa, J. & Fuse, H. Ligand-Selective Potentiation of Rat Mineralocorticoid Receptor Activation Function 1 by a CBP-Containing Histone Acetyltransferase Complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3698–706 (2002).
43. Walther, R. F. *et al.* A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **280**, 17549–61 (2005).
44. Tsai, M. & Malley, B. W. O. Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 451–86 (1994).
45. Pascual-Le Tallec, L. & Lombès, M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol. Endocrinol.* **19**, 2211–21 (2005).
46. Fuller, P. J. & Young, M. J. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* **46**, 1227–35 (2005).
47. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306–60 (1997).
48. Tait, J. F., Grundy, H. M. & Simpson, S. A. The effect of adrenal extract on mineral metabolism. *Lancet* 122–124 (1951).
49. Simpson, S. A. & Tait, J. F. Secretion of a salt-retaining hormone by the mammalian adrenal cortex. *Lancet* 226–228 (1952).
50. Funder, J. W. Aldosterone and mineralocorticoid receptors: a personal reflection. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 146–50 (2012).
51. Kumar, R., Thomas, C. M., Yong, Q. C., Chen, W. & Baker, K. M. The intracrine renin-angiotensin system. *Clin. Sci.* **123**, 273–84 (2012).
52. Nguyen Dinh Cat, A. & Touyz, R. M. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. *Peptides* **32**, 2141–50 (2011).
53. Quinn, S. J. & Williams, G. H. Regulation of aldosterone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* **50**, 409–26 (1988).
54. Bassett, M. H., White, P. C. & Rainey, W. E. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* **217**, 67–74 (2004).
55. Lin, D. *et al.* Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* **267**, 1828–31 (1995).

56. Cherradi, N., Brandenburger, Y. & Capponi, a M. Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Eur. J. Endocrinol.* **139**, 249–56 (1998).
57. Curnow, K. M. *et al.* The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1513–22 (1991).
58. Beuschlein, F. Regulation of aldosterone secretion: from physiology to disease. *Eur. J. Endocrinol.* **168**, R85–93 (2013).
59. De Mello, W. C. Regulation of cell volume and water transport - An old fundamental role of the renin angiotensin aldosterone system components at the cellular level. *Peptides* **58C**, 74–77 (2014).
60. Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P. B. & Ndebele, K. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *Int. J. Inflam.* **2014**, 689360 (2014).
61. Hayden, M. R. *et al.* Possible Mechanisms of Local Tissue Renin-Angiotensin System Activation in the Cardiorenal Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus. *Cardiorenal Med.* **1**, 193–210 (2011).
62. Bader, M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50**, 439–65 (2010).
63. Aroor, A. R. *et al.* The role of tissue Renin-Angiotensin-aldosterone system in the development of endothelial dysfunction and arterial stiffness. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 161 (2013).
64. Rogerson, F. M. Structural Determinants of Aldosterone Binding Selectivity in the Mineralocorticoid Receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 36305–36311 (1999).
65. Huyet, J., Pinon, G. M., Fay, M. R., Rafestin-Oblin, M.-E. & Fagart, J. Structural determinants of ligand binding to the mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 187–95 (2012).
66. Rogerson, F. M. *et al.* A critical region in the mineralocorticoid receptor for aldosterone binding and activation by cortisol: evidence for a common mechanism governing ligand binding specificity in steroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol.* **21**, 817–28 (2007).
67. Arriza, J. L. *et al.* Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* **237**, 268–75 (1987).

68. Odermatt, A. & Kratschmar, D. V. Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: an overview. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 168–86 (2012).
69. White, P. C., Mune, T. & Agarwal, A. K. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase and the Syndrome of Apparent Mineralocorticoid Excess. *Endocr. Rev.* **18**, 22 (1997).
70. Hadoke, P. W. F., Kipari, T., Seckl, J. R. & Chapman, K. E. Modulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a strategy to reduce vascular inflammation. *Curr. Atheroscler. Rep.* **15**, 320 (2013).
71. Young, M. J. & Funder, J. W. Mineralocorticoid receptors and pathophysiological roles for aldosterone in the cardiovascular system. *J. Hypertens.* **20**, 1465–8 (2002).
72. Rogerson, F. M., Brennan, F. E. & Fuller, P. J. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **217**, 203–12 (2004).
73. Buner, K., Derfaul, A. & Robertson, N. The Unliganded Mineralocorticoid Receptor is Associated with Heat Shock Proteins 70 and 90 and the Immunophilin FKBP-52. *Recept. Signal Transduct.* **7**, 85–98 (1997).
74. Faresse, N., Ruffieux-daidie, D., Salamin, M., Gomez-sanchez, C. E. & Staub, O. Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **299**, 1462–1472 (2010).
75. Yang, J. & Fuller, P. J. Interactions of the mineralocorticoid receptor--within and without. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 196–205 (2012).
76. Trapp, T. & Holsboer, F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**, 145–9 (1996).
77. Funder, J. W. Mineralocorticoids, Glucocorticoids, Receptors and Response Elements. *Science (80-.)*. **259**, 1132–1133 (1993).
78. Lombès, M., Binart, N., Oblin, M. E., Joulin, V. & Baulieu, E. E. Characterization of the interaction of the human mineralocorticosteroid receptor with hormone response elements. *Biochem. J.* **292**, 577–83 (1993).
79. McEwan, I. J. & Nardulli, A. M. Nuclear hormone receptor architecture - form and dynamics: The 2009 FASEB Summer Conference on Dynamic Structure of the Nuclear Hormone Receptors. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e011 (2009).

80. Lingueglia, E. *et al.* Different homologous subunits of the amiloride-sensitive Na⁺ channel are differently regulated by aldosterone. *J. Biol. Chem.* **269**, 13736–9 (1994).
81. Brennan, F. E. & Fuller, P. J. Acute regulation by corticosteroids of channel-inducing factor gene messenger ribonucleic acid in the distal colon. *Endocrinology* **140**, 1213–8 (1999).
82. Bhargava, A. *et al.* The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* **142**, 1587–94 (2001).
83. Rogerson, F. M., Brennan, F. E. & Fuller, P. J. Dissecting mineralocorticoid receptor structure and function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **85**, 389–396 (2003).
84. Rogerson, F. M. & Fuller, P. J. Mineralocorticoid action. *Steroids* **65**, 61–73 (2000).
85. Brennan, F. E. & Fuller, P. J. Mammalian K-ras2 is a corticosteroid-induced gene in vivo. *Endocrinology* **147**, 2809–16 (2006).
86. Boulkroun, S. *et al.* Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 31506–15 (2002).
87. Funder, J. W. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr. Rev.* **26**, 313–21 (2005).
88. Grossmann, C. & Gekle, M. New aspects of rapid aldosterone signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **308**, 53–62 (2009).
89. Dooley, R., Harvey, B. J. & Thomas, W. Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 223–34 (2012).
90. Grossmann, C. & Gekle, M. Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. *Steroids* **73**, 973–8 (2008).
91. Grossmann, C. & Gekle, M. Interaction between mineralocorticoid receptor and epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 235–41 (2012).
92. Liu, S. L., Schmuck, S., Chorazczyewski, J. Z., Gros, R. & Feldman, R. D. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation* **108**, 2400–6 (2003).

93. Grossmann, C. *et al.* Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1697–710 (2005).
94. Gros, R. *et al.* GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension* **57**, 442–51 (2011).
95. Alzamora, R., Brown, L. R. & Harvey, B. J. Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by aldosterone and 17beta-estradiol. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2637–50 (2007).
96. Gekle, M. & Grossmann, C. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Arch.* **458**, 231–46 (2009).
97. Pitt, B. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N. Engl. J. Med.* **341**, 709–717 (1999).
98. Pitt, B. *et al.* Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1309–1321 (2003).
99. Young, M. & Funder, J. W. Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology* **145**, 3153–7 (2004).
100. Tanaka-Esposito, C., Varahan, S., Jeyaraj, D., Lu, Y. & Stambler, B. S. Eplerenone-Mediated Regression of Electrical Activation Delays and Myocardial Fibrosis in Heart Failure. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **25**, 537–544 (2014).
101. Von Lueder, T. G. & Krum, H. RAAS inhibitors and cardiovascular protection in large scale trials. *Cardiovasc. drugs Ther.* **27**, 171–9 (2013).
102. Kolkhof, P. & Borden, S. a. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 310–7 (2012).
103. Pitt, B. Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEBUS studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **217**, 53–8 (2004).
104. McCurley, A. & Jaffe, I. Z. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2011). doi:10.1016/j.mce.2011.06.014
105. Rocha, R., Chander, P. N., Khanna, K., Zuckerman, a. & Stier, C. T. Mineralocorticoid Blockade Reduces Vascular Injury in Stroke-Prone Hypertensive Rats. *Hypertension* **31**, 451–458 (1998).

106. Rocha, R. *et al.* Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1802–10 (2002).
107. Rocha, R. Selective Aldosterone Blockade Prevents Angiotensin II/Salt-Induced Vascular Inflammation in the Rat Heart. *Endocrinology* **143**, 4828–4836 (2002).
108. Xanthakis, V. & Vasan, R. Aldosterone and the Risk of Hypertension. *Curr. hyper* **15**, 102–107 (2014).
109. Lastra, G., Dhuper, S., Johnson, M. S. & Sowers, J. R. Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**, 577–84 (2010).
110. McCurley, A. *et al.* Direct Regulation of Blood Pressure by Smooth Muscle Cell Mineralocorticoid Receptors. *Nat. Med.* **18**, 1429–1433 (2013).
111. Gaddam, K. K., Pimenta, E., Husain, S. & Calhoun, D. a. Aldosterone and cardiovascular disease. *Curr. Probl. Cardiol.* **34**, 51–84 (2009).
112. Calhoun, D. a. Hyperaldosteronism as a common cause of resistant hypertension. *Annu. Rev. Med.* **64**, 233–47 (2013).
113. Meneton, P., Jeunemaitre, X., Wardener, H. E. D. E. & Macgregor, G. A. Links Between Dietary Salt Intake , Renal Salt Handling , Blood Pressure , and Cardiovascular Diseases. *Physiol. Rev.* **85**, 679–715 (2005).
114. Duprez, D. A. Aldosterone and the Vasculature: Mechanisms Mediating Resistant Hypertension. *J. Clin. Hypertens.* **9**, (2007).
115. Rossi, G. P., Sacchetto, A., Pavan, E., Palatini, P. & Graniero, G. R. Remodeling of the Left Ventricle in Primary Aldosteronism due to Conn’s Adenoma. *Circulation* **95**, 1471–78 (1997).
116. Tanabe, A. *et al.* Left ventricular hypertrophy is more prominent in patients with primary aldosteronism than in patients with other types of secondary hypertension. *Hypertens. Res.* **20**, 85–90 (1997).
117. Qin, W. *et al.* Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* **93**, 69–76 (2003).
118. Hattori, T. *et al.* Effects of salt status and blockade of mineralocorticoid receptors on aldosterone-induced cardiac injury. *Hypertens. Res.* **27**, 125–133 (2014).
119. Ehsan, A. *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism inhibits vein graft remodeling in mice. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **145**, 1642–9, 1649.e1 (2013).

120. Hargovan, M. & Ferro, A. Aldosterone synthase inhibitors in hypertension: current status and future possibilities. *JRSM Cardiovasc. Dis.* **3**, 2048004014522440 (2014).
121. Funder, J. W. Aldosterone synthase and mineralocorticoid receptors as targets in cardiovascular disease. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **2**, 231–235 (2005).
122. Garg, R. & Adler, G. K. *Aldosterone and its Cardiovascular Effects. Textb. Nephro-Endocrinology* (Elsevier Ltd., 2009). doi:10.1016/B978-0-12-373870-7.00023-5
123. Marney, A. M. & Brown, N. J. Aldosterone and end-organ damage. *Clin. Sci. (Lond)*. **113**, 267–78 (2007).
124. Callera, G. E. *et al.* Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* **45**, 773–9 (2005).
125. Arima, S. *et al.* Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole. *Hypertension* **43**, 352–7 (2004).
126. Gekle, M., Mildenerger, S., Freudinger, R. & Grossmann, C. Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. *Pflugers Arch.* **454**, 403–13 (2007).
127. Robert, V. *et al.* Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* **24**, 30–36 (1994).
128. Brilla, C., Zhou, G., Matsubara, L. & Weber, K. Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **26**, 809–820 (1994).
129. Young, M. J., Moussa, L., Dille, R. & Funder, J. W. Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology* **144**, 1121–5 (2003).
130. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–54 (1993).
131. Bartel, D. P., Lee, R. & Feinbaum, R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. *Cell* **116**, 281–297 (2004).
132. Tétreault, N. & De Guire, V. miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin. Biochem.* **46**, 842–5 (2013).
133. Gurtan, A. M. & Sharp, P. a. The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *J. Mol. Biol.* **425**, 3582–600 (2013).

134. Ambros, V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* **107**, 823–6 (2001).
135. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431**, 350–5 (2004).
136. Ibáñez-Ventoso, C., Vora, M. & Driscoll, M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* **3**, e2818 (2008).
137. Chiang, H. R. *et al.* Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.* **24**, 992–1009 (2010).
138. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–39 (2009).
139. Altuvia, Y. *et al.* Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2697–706 (2005).
140. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–60 (2004).
141. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–101 (2006).
142. Lee, Y. S. & Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 199–227 (2009).
143. Cai, X., Hagedorn, C. H. & Cullen, B. R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957–1966 (2004).
144. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 228–34 (2009).
145. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–9 (2003).
146. Han, J. *et al.* The Drosha – DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–3027 (2004).
147. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–40 (2004).
148. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. & Kim, V. N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**, 4663–70 (2002).

149. Kim, V. N. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* **14**, 156–9 (2004).
150. Gwizdek, C. *et al.* Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J. Biol. Chem.* **278**, 5505–8 (2003).
151. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95–8 (2004).
152. Yi, R. U. I., Doehle, B. P., Qin, Y. I., Macara, I. A. N. G. & Cullen, B. R. Overexpression of Exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* **11**, 220–226 (2005).
153. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Görlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–191 (2004).
154. Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834–8 (2001).
155. Knight, S. W. & Bass, B. L. A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **293**, 2269–71 (2001).
156. Lau, P.-W. *et al.* The molecular architecture of human Dicer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 436–40 (2012).
157. Haase, A. D. *et al.* TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* **6**, 961–7 (2005).
158. Lee, Y. *et al.* The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* **25**, 522–32 (2006).
159. Koscianska, E., Starega-Roslan, J. & Krzyzosiak, W. J. The role of Dicer protein partners in the processing of microRNA precursors. *PLoS One* **6**, e28548 (2011).
160. MacRae, I. J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C. V & Doudna, J. a. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 512–7 (2008).
161. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–4 (2005).
162. Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. & Zamore, P. D. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* **123**, 607–20 (2005).

163. Leuschner, P. J. F., Ameres, S. L., Kueng, S. & Martinez, J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* **7**, 314–20 (2006).
164. Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N. & Shiekhattar, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* **123**, 631–40 (2005).
165. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209–16 (2003).
166. Siomi, M. C. & Siomi, H. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **105**, 59–60 (2008).
167. Liu, J. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437–41 (2004).
168. Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**, 185–97 (2004).
169. Davis, B. N. & Hata, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem.* **September**, (2010).
170. Finnegan, E. F. & Pasquinelli, A. E. MicroRNA biogenesis : Regulating the Regulators. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 51–68 (2014).
171. Fukuda, T. *et al.* DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.* **9**, 604–11 (2007).
172. Suzuki, H. I. *et al.* Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* **460**, 529–33 (2009).
173. Conidi, A. *et al.* Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGF β /BMP signaling in vivo. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 287–300 (2011).
174. Blahna, M. T. & Hata, A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Lett.* **586**, 1906–12 (2012).
175. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G. & Hata, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **454**, 56–61 (2008).
176. Davis, B. N. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* **39**, 373–384 (2010).

177. Michlewski, G., Guil, S., Semple, C. a & Cáceres, J. F. Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol. Cell* **32**, 383–93 (2008).
178. Michlewski, G., Guil, S. & Cáceres, J. F. in *Adv. Exp. Med. Biol.* **700**, 28–35 (2011).
179. Buratti, E. *et al.* Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS J.* **277**, 2268–81 (2010).
180. Kawahara, Y. & Mieda-Sato, A. TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 3347–52 (2012).
181. Newman, M. A., Thomson, J. M. & Hammond, S. M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* **14**, 1539–1549 (2008).
182. Piskounova, E. *et al.* Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J. Biol. Chem.* **283**, 21310–4 (2008).
183. Viswanathan, S. R., Daley, G. Q. & Gregory, R. I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**, 97–100 (2008).
184. Danno, S. *et al.* Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 804–7 (1997).
185. Dresios, J. *et al.* Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1865–70 (2005).
186. Pilotte, J., Dupont-Versteegden, E. E. & Vanderklish, P. W. Widespread regulation of miRNA biogenesis at the Dicer step by the cold-inducible RNA-binding protein, RBM3. *PLoS One* **6**, e28446 (2011).
187. Suzuki, H. I. *et al.* MCPIP1 ribonuclease antagonizes dicer and terminates microRNA biogenesis through precursor microRNA degradation. *Mol. Cell* **44**, 424–36 (2011).
188. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–14 (2008).
189. Chu, C. & Rana, T. M. Small RNAs : Regulators and Guardians of the Genome. *J. Cell. Physiol.* 412–419 (2007). doi:10.1002/JCP

190. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* **3**, e85 (2005).
191. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
192. Grimson, A. *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105 (2007).
193. Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J. & Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **20**, 515–24 (2006).
194. Nielsen, C. B. *et al.* Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* **13**, 1894–910 (2007).
195. Ventura, A. *et al.* Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* **132**, 875–86 (2008).
196. Doench, J. G. & Sharp, P. a. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* **18**, 504–11 (2004).
197. Pillai, R. S., Artus, C. G. & Filipowicz, W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* **10**, 1518–1525 (2004).
198. Hutvagner, G. & Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 22–32 (2008).
199. Kiriakidou, M. *et al.* An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* **129**, 1141–51 (2007).
200. Wu, L., Fan, J. & Belasco, J. G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4034–9 (2006).
201. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* **20**, 1885–98 (2006).
202. Giraldez, A. J. *et al.* Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**, 75–9 (2006).
203. Kai, Z. S. & Pasquinelli, A. E. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 5–10 (2010).
204. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 597–610 (2010).

205. Gantier, M. P. *et al.* Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5692–703 (2011).
206. Van Rooij, E. *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* **316**, 575–9 (2007).
207. Diederichs, S. & Haber, D. a. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* **131**, 1097–108 (2007).
208. Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T. & Patel, D. J. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* **456**, 209–13 (2008).
209. Chen, A.-J. *et al.* STAR RNA-binding protein Quaking suppresses cancer via stabilization of specific miRNA. *Genes Dev.* **26**, 1459–72 (2012).
210. Hwang, H.-W., Wentzel, E. A. & Mendell, J. T. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* **315**, 97–100 (2007).
211. Bueno, M. J. & Malumbres, M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 592–601 (2011).
212. Bail, S. *et al.* Differential regulation of microRNA stability. *RNA* **16**, 1032–1039 (2010).
213. Zhang, Z. *et al.* Uracils at nucleotide position 9-11 are required for the rapid turnover of miR-29 family. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4387–95 (2011).
214. Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. & Chen, X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **15**, 1501–7 (2005).
215. Yu, B. *et al.* Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* **307**, 932–5 (2005).
216. Bronze-da-Rocha, E. MicroRNAs Expression Profiles in Cardiovascular Diseases. *Biomed Res. Int.* **2014**, 985408 (2014).
217. Fernandez-Hernando, C. MicroRNAs and Cardiovascular Disease. *Curr. Genet. Med. Rep.* **1**, 30–38 (2014).
218. Aryal, B. . N. R. C. F.-H. Non-coding RNAs and Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **16**, (2014).
219. Boettger, T. *et al.* Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143 / 145 gene cluster. *J. Clin. Invest.* **119**, (2009).

220. Xin, M. *et al.* MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev.* **23**, 2166–78 (2009).
221. Cordes, K. R. *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* **460**, 705–10 (2009).
222. Lovren, F. *et al.* MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis. *Circulation* **126**, S81–90 (2012).
223. Hergenreider, E. *et al.* Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* **14**, 249–56 (2012).
224. Ji, R. *et al.* MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.* **100**, 1579–88 (2007).
225. Kang, H. *et al.* Bone morphogenetic protein 4 promotes vascular smooth muscle contractility by activating microRNA-21 (miR-21), which down-regulates expression of family of dedicator of cytokinesis (DOCK) proteins. *J. Biol. Chem.* **287**, 3976–86 (2012).
226. Wang, M. *et al.* MicroRNA-21 regulates vascular smooth muscle cell function via targeting tropomyosin 1 in arteriosclerosis obliterans of lower extremities. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2044–53 (2011).
227. Boon, R. a *et al.* MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. *Circ. Res.* **109**, 1115–9 (2011).
228. Merk, D. R. *et al.* miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circ. Res.* **110**, 312–24 (2012).
229. Van Rooij, E. *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13027–32 (2008).
230. Suárez, Y. & Fernández-Hernando, C. New insights into microRNA-29 regulation: a new key player in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 584–6 (2012).
231. Liu, X. *et al.* A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ. Res.* **104**, 476–87 (2009).
232. Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G. & Hata, A. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J. Biol. Chem.* **284**, 3728–38 (2009).

233. Zhang, Y. *et al.* Insulin promotes vascular smooth muscle cell proliferation via microRNA-208-mediated downregulation of p21. *J. Hypertens.* **29**, 1560–8 (2011).
234. Choe, N. *et al.* The microRNA miR-132 targets Lrrfip1 to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis* **229**, 348–55 (2013).
235. Yu, M.-L. *et al.* Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Is Influenced by let-7d MicroRNA and Its Interaction With KRAS. *Circ. J.* **75**, 703–709 (2011).
236. Chen, K.-C. *et al.* Negative feedback regulation between microRNA let-7g and the oxLDL receptor LOX-1. *J. Cell Sci.* **124**, 4115–24 (2011).
237. Zhang, Y., Chen, N., Zhang, J. & Tong, Y. Hsa-let-7g miRNA targets caspase-3 and inhibits the apoptosis induced by ox-LDL in endothelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 22708–20 (2013).
238. Liao, Y.-C. *et al.* Let-7g improves multiple endothelial functions through targeting transforming growth factor-beta and SIRT-1 signaling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 1685–94 (2014).
239. Fish, J. E. *et al.* miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev. Cell* **15**, 272–84 (2008).
240. Wang, S. *et al.* An Endothelial-specific microRNA Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev. Cell* **15**, 261–271 (2009).
241. Fasanaro, P. *et al.* MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* **283**, 15878–83 (2008).
242. Doebele, C. *et al.* Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Vasc. Biol.* **115**, 4944–4950 (2010).
243. Bonauer, A. *et al.* MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* **324**, 1710–3 (2009).
244. Söber, S., Laan, M. & Annilo, T. MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 727–32 (2010).
245. Robertson, S. *et al.* MicroRNA-24 is a novel regulator of aldosterone and cortisol production in the human adrenal cortex. *Hypertension* **62**, 572–8 (2013).
246. Romero, D. G., Plonczynski, M. W., Carvajal, C. a, Gomez-Sanchez, E. P. & Gomez-Sanchez, C. E. Microribonucleic acid-21 increases aldosterone secretion

- and proliferation in H295R human adrenocortical cells. *Endocrinology* **149**, 2477–83 (2008).
247. Nossent, a Y. *et al.* SNPs in microRNA binding sites in 3'-UTRs of RAAS genes influence arterial blood pressure and risk of myocardial infarction. *Am. J. Hypertens.* **24**, 999–1006 (2011).
248. Azibani, F. *et al.* Aldosterone inhibits the fetal program and increases hypertrophy in the heart of hypertensive mice. *PLoS One* **7**, e38197 (2012).
249. Edinger RS, Coronello C, Bodnar AJ, Laframboise WA, Benos PV, Ho J, Johnson JP, B. M. Aldosterone Regulates MicroRNAs in the Cortical Collecting Duct to Alter Sodium Transport. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2014).
250. Li, D., Lu, Z., Jia, J., Zheng, Z. & Lin, S. Changes in microRNAs associated with podocytic adhesion damage under mechanical stress. *J. Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.* **14**, 97–102 (2013).
251. Chang, T.-C. *et al.* Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* **40**, 43–50 (2008).
252. Eyholzer, M., Schmid, S., Wilkens, L., Mueller, B. U. & Pabst, T. The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *Br. J. Cancer* **103**, 275–84 (2010).
253. Mott, J. L. *et al.* Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *J. Cell. Biochem.* **110**, 1155–64 (2010).
254. Qin, W. *et al.* TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 1462–74 (2011).
255. Liu, Y. *et al.* Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension* **55**, 974–982 (2010).
256. Castanotto, D., Lingeman, R., Riggs, A. D. & Rossi, J. J. CRM1 mediates nuclear-cytoplasmic shuttling of mature microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21655–9 (2009).
257. Naga Prasad, S. V *et al.* Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J. Biol. Chem.* **284**, 27487–99 (2009).
258. Dawson, K. *et al.* MicroRNA29: a mechanistic contributor and potential biomarker in atrial fibrillation. *Circulation* **127**, 1466–75, 1475e1–28 (2013).
259. Rezaei, M. *et al.* Regulation of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 by MicroRNA. *Hypertension* 1–7 (2014).
doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.00002

260. Li, Z. *et al.* Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* **284**, 15676–84 (2009).
261. Sengupta, S. *et al.* MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5874–8 (2008).
262. Lan, H. Y. & Chung, A. C. K. Transforming growth factor- β and Smads. *Contrib. Nephrol.* **170**, 75–82 (2011).
263. Kuang, P. *et al.* Activation of elastin transcription by transforming growth factor- β in human lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **02118**, 944–952 (2007).
264. Lei, J., Silbiger, S., Ziyadeh, F. N. & Neugarten, J. Serum-stimulated alpha 1 type IV collagen gene transcription is mediated by TGF-beta and inhibited by estradiol. *Am. J. Physiol.* **274**, F252–8 (1998).
265. Neumann, C., Yu, A., Welge-Lüssen, U., Lütjen-Drecoll, E. & Birke, M. The effect of TGF-beta2 on elastin, type VI collagen, and components of the proteolytic degradation system in human optic nerve astrocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 1464–72 (2008).
266. Sysa, P., Potter, J., Liu, X. & Mezey, E. Transforming Growth Factor- β 1 Up-Regulation of Human α 1(I) Collagen is Mediated by Sp1 and Smad2 Transacting Factors. *DNA Cell Biol.* **28**, 425–434 (2009).
267. Border, W. A. & Noble, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1286–92 (1994).
268. Ye, Y., Hu, Z., Lin, Y., Zhang, C. & Perez-Polo, J. R. Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **87**, 535–44 (2010).
269. Ott, C. E. *et al.* MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites. *PLoS One* **6**, e16250 (2011).
270. He, Y., Huang, C., Lin, X. & Li, J. MicroRNA-29 family, a crucial therapeutic target for fibrosis diseases. *Biochimie* **95**, 1355–9 (2013).
271. Amodio, N. *et al.* miR-29b induces SOCS-1 expression by promoter demethylation and negatively regulates migration of multiple myeloma and endothelial cells. *Cell Cycle* **12**, 3650–62 (2012).
272. Wang, C., Bian, Z., Wei, D. & Zhang, J. miR-29b regulates migration of human breast cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **352**, 197–207 (2011).

273. Chen, K.-C. *et al.* OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J.* **25**, 1718–28 (2011).
274. Calin, G. A. *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1793–801 (2005).
275. Pekarsky, Y. *et al.* Tc11 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* **66**, 11590–3 (2006).
276. Nguyen, T. *et al.* Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics* **6**, 388–394 (2011).
277. Xiong, Y. *et al.* Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **51**, 836–45 (2010).
278. Yanaihara, N. *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9**, 189–98 (2006).
279. Li, Y. *et al.* Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J. Pathol.* **224**, 484–95 (2011).
280. Cummins, J. M. *et al.* The colorectal microRNAome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3687–92 (2006).
281. Garzon, R. *et al.* MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* **114**, 5331–41 (2009).
282. Mott, J. L., Kobayashi, S., Bronk, S. F. & Gores, G. J. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* **26**, 6133–40 (2007).
283. Zhao, J. *et al.* MicroRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* **115**, 2630–2639 (2010).
284. Park, S.-Y., Lee, J. H., Ha, M., Nam, J.-W. & Kim, V. N. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 23–9 (2009).
285. Abonnenc, M. *et al.* Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c. *Circ. Res.* **113**, 1138–47 (2013).
286. Winbanks, C. E. *et al.* TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. *J. Biol. Chem.* **286**, 13805–14 (2011).

287. Jo, D. H. *et al.* Differential profiles of microRNAs in retinoblastoma cell lines of different proliferation and adherence patterns. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **33**, 529–33 (2011).
288. Ma, F. *et al.* The microRNA miR-29 controls innate and adaptive immune responses to intracellular bacterial infection by targeting interferon- γ . *Nat. Immunol.* **12**, 861–9 (2011).
289. Schreier, B. *et al.* Aldosterone/NaCl-induced renal and cardiac fibrosis is modulated by TGF- β responsiveness of T cells. *Hypertens. Res.* **34**, 623–9 (2011).
290. Czimmerer, Z. *et al.* A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One* **8**, e55168 (2013).
291. Lane, R. D., Federman, D., Flora, J. L. & Beck, B. L. Computer-assisted determination of protein concentrations from dye-binding and bicinchoninic acid protein assays performed in microtiter plates. *J. Immunol. Methods* **92**, 261–70 (1986).
292. Schwerdt, G. *et al.* Long-term effects of ochratoxin A on fibrosis and cell death in human proximal tubule or fibroblast cells in primary culture. *Toxicology* **232**, 57–67 (2007).
293. Bretschneider, M. *et al.* Activated mineralocorticoid receptor regulates micro-RNA-29b in vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* (2016). doi:10.1096/fj.15-271254
294. Fleissner, F. *et al.* Short communication: asymmetric dimethylarginine impairs angiogenic progenitor cell function in patients with coronary artery disease through a microRNA-21-dependent mechanism. *Circ. Res.* **107**, 138–43 (2010).
295. Wei, L. H. *et al.* Deficiency of Smad7 enhances cardiac remodeling induced by angiotensin II infusion in a mouse model of hypertension. *PLoS One* **8**, e70195 (2013).
296. Kriegel, A. J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X. & Liang, M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol. Genomics* **44**, 237–44 (2012).
297. Thum, T. *et al.* MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **456**, 980–4 (2008).
298. Van Rooij, E. & Kauppinen, S. Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Mol. Med.* **6**, 851–864 (2014).

299. Izzard, C. S. & Lochner, L. R. Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. *J. Cell Sci.* **42**, 81–116 (1980).
300. Lauffenburger, D. a & Horwitz, a F. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359–69 (1996).
301. Porter, a G. & Jänicke, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99–104 (1999).
302. Stennicke, H. R. Biochemical Characteristics of Caspases-3, -6, -7, and -8. *J. Biol. Chem.* **272**, 25719–25723 (1997).
303. Zhang, Y.-K. *et al.* Overexpression of microRNA-29b induces apoptosis of multiple myeloma cells through down regulating Mcl-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **414**, 233–9 (2011).
304. Fu, G., Xu, C., Zhong, Y., Zhu, D. & Gao, P. Aldosterone-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves MR, ERK, and p38 MAPK. *Endocrine* **42**, 676–83 (2012).
305. Chen, Z. & Yao, W. Role of Rho/ROCK in the migration of vascular smooth muscle cells. *Prog. Physiol.* **44**, 269–74 (2013).

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AAA	abdominales Aortenaneurysma
Abb.	Abbildung
Act D	Actinomycin D
Aldo	Aldosteron
BCA	Bicichinonsäure Assay
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	Copy-DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
HAoSMC	humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen (Primärkultur)
HA-VSMC	humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen (Zelllinie)
HRP	Meerrettich Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IL	Interleukin
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LNA	locked nucleic acid
miR	microRNA
MOI	multiplicity of transfection \equiv Viren pro Zelle
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pre-miR	Vorläufer microRNA
pri-miR	primäres microRNA-Transkript

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SEM	standard error of mean
snRNA	kleine nukleoläre RNA (small nucleolar RNA)
Tab.	Tabelle
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VSMC	vaskuläre glatte Gefäßmuskelzelle
α -SMA	α -smooth muscle actin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau von arteriellen Gefäßen des muskulären Typs...	3
Abbildung 2-2: Schematischer Aufbau des humanen MR (nach ³⁸)	6
Abbildung 2-3: Regulation des RAAS.	7
Abbildung 2-4: MiR Biosynthese (aus ¹⁴⁴).	14
Abbildung 2-5: Wirkungsweise von miRs (nach ¹⁸⁸).	17
Abbildung 2-6: Mitglieder der miR-29-Familie sind in Clustern codiert und haben eine überlappende Sequenz.	20
Abbildung 4-1: MR-Nachweis in primären humanen Gefäßzellen mittels Western Blot.	44
Abbildung 4-2: Aldosteron senkt die miR-29b-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen.	45
Abbildung 4-3: Reporter-Gen-Assay zur Validierung der miR-29b-Funktion und des Aldosteroneffekts.	46
Abbildung 4-4: Aldosteron reduziert miR-29b als einziges Mitglied der miR-29-Familie.	47
Abbildung 4-5: Endothelin-1 zeigt keinen Effekt auf die miR-29-Familie in HA-VSMC.	48
Abbildung 4-6: Aldosteron beeinflusst Mitglieder der miR-29-Familie <i>in vivo</i> .	49
Abbildung 4-7: Eplerenon hemmt den Aldosteroneffekt bezüglich miR-29b in HA-VSMCs.	49
Abbildung 4-8: Aldosteron wirkt über den MR auf miR-29b.	53
Abbildung 4-9: Schema der miR-Reifung. Der Fokus lag hier auf dem primären Transkript (pri-miR).	54
Abbildung 4-10: Pri-miR-Nachweis nach Aldosteroninkubation.	54
Abbildung 4-11: Pri-miR-Expression nach Actinomycin D-Vorinkubation und Aldosteronstimulation.	55
Abbildung 4-12: Pri-miR-Gehalt im Actinomycin D-Zeitverlauf.	56
Abbildung 4-13: Schema der miR-Reifung. Der Fokus lag hier auf der Vorläufer-miR (pre-miR).	57
Abbildung 4-14: Pre-miR-29b-Sequenzen und ihre Aldosteronabhängigkeit.	57
Abbildung 4-15: Pre-miR-29-Gehalt nach Actinomycin D-Vorinkubation.	58

Abbildung 4-16: Pre-miR-Gehalt im Actinomycin D-Zeitverlauf.	58
Abbildung 4-17: Schema der miRNA-Reifung. Der Fokus lag hierbei auf der reifen miR.	59
Abbildung 4-18: Gehalt an reifen miRs nach Actinomycin D-Vorinkubation.	60
Abbildung 4-19: Gehalt reifer miRs im Actinomycin D-Zeitverlauf.	60
Abbildung 4-20: Einfluss von Aldosteron auf die Verteilung der miR-29-Familie zwischen Kern und Zytoplasma.	62
Abbildung 4-21: Schema der potenziellen miR-29b-Regulation.	66
Abbildung 4-22: MiR-29b beeinflusst die mRNA-Menge von diversen Kollagenen und von Fibronectin.	68
Abbildung 4-23: Duplexbildung der miR-29b mit dem 3'UTR der Zieltranskripte.	69
Abbildung 4-24: MiR-29b beeinflusst die Proteinmenge diverser Kollagene und Fibronectin.	70
Abbildung 4-25: Hypothese zur Regulation extrazellulärer Matrix durch Aldosteron. .	73
Abbildung 4-26: MiR-29b verlangsamt die Wundheilung bei A7r5 Zellen.	74
Abbildung 4-27: MiR-29b inhibiert die Migration lentiviral transfizierter HAoSMCs. 76	
Abbildung 4-28: Anzahl haftender A7r5 Zellen 6 h nach Ansaat.	77
Abbildung 4-29: Ein veränderter Gehalt an miR-29b fördert die Proliferation.	79
Abbildung 4-30: MiR-29b zeigt keinen Einfluss auf die Zellgröße.	80
Abbildung 4-31: MiR-29b wirkt leicht anti-nekrotisch in glatten Gefäßmuskelzellen. 82	
Abbildung 4-32: MiR-29b zeigt einen leicht pro-apoptotischen Effekt in glatten Gefäßmuskelzellen.	83
Abbildung 4-33: Geringe miR-29b-Mengen begünstigen den sekretorischen Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen.	86
Abbildung 4-34: Die Migration von VSMCs wird durch Aldosteron erhöht.	87
Abbildung 4-35: Aldosteronwirkung auf die Migration spezifisch transfizierter HAoSMCs.	88
Abbildung 4-36: Aldosteron bewirkt eine gesteigerte Migration glatter Gefäßmuskelzellen durch Reduktion der miR-29b.	90
Abbildung 4-37: Erreichter Transfektionsgehalt an miR-29b in lentiviral transfizierten HAoSMCs.	92

Abbildung 4-38: Erreichter Gehalt an miR-29b durch Transfektion mit Fugene HD in HAoSMCs.	93
Abbildung 4-39: Erreichter Gehalt an miR-29b durch Transfektion mit Fugene HD in A7r5 Zellen.....	94
Abbildung 5-1: Zusammenfassung der neuen Erkenntnisse	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: verwendete Zelllinien.....	25
Tabelle 3-2: verwendete miR-Oligonukleotide zur Transfektion.....	27
Tabelle 3-3: lentivirale Oligo-Sequenzen.....	28
Tabelle 3-4: Zusammensetzung des Ansatzes zur Reversen Transkription	31
Tabelle 3-5: Ablauf der Reversen Transkription.....	32
Tabelle 3-6: Zusammensetzung eines qPCR Ansatzes.....	32
Tabelle 3-7: Ablauf der qPCR.....	33
Tabelle 3-8: verwendete qPCR Primer.....	33
Tabelle 3-9: verwendete TaqMan Sonden in der qPCR.....	34
Tabelle 3-10: RT looped Primer für pre-miR-Nachweis.....	34
Tabelle 3-11: verwendete Antikörper im <i>Western Blot</i>	37
Tabelle 3-12: verwendete Antikörper im ELISA	38
Tabelle 3-13: verwendete Plasmide in der Reporter-Gen Analyse	38
Tabelle 3-14: verwendete Puffer und Lösungen.....	41
Tabelle 4-1: Übersicht über miR-29-Intermediate der Reifung bezüglich verschiedener Aldosteronstimulationen ohne bzw. mit Actinomycin D.	63
Tabelle 4-2: Migrationswege der lentiviral transfizierten HAoSMCs.	75
Tabelle 4-3: Lentivirale Transfektion primärer aortaler, glatter Gefäßmuskelzellen (HAoSMC).	91

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mir die Entstehung dieser Dissertation ermöglicht haben und mich auf meinem Weg dorthin unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Gekle, dass er mir die Bearbeitung dieses Dissertationsthemas am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie ermöglichte. Weiterhin bedanke ich mich für die immer konstruktiven Hinweise und Denkanstöße sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Besonders möchte ich mich bei Frau Jun.-Prof. Dr. Dr. Claudia Grossmann bedanken für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, ihre stetige Unterstützung und wertvolle Hilfe bei Problemen und Unklarheiten.

Einen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Dr. Neubert für die Betreuung und Beurteilung dieser Arbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät I.

Der DFG möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK1591 danken.

Danke an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen sowie allen meinen Mitdoktoranden des Julius-Bernstein-Instituts für die außerordentlich gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Diese Arbeit wäre ohne ihre Hilfe nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Mann und unseren zwei Kindern. Ohne Ihre Liebe, Unterstützung, Geduld und zeitweilige Ablenkung von der Arbeit wäre ich nicht so weit gekommen.

Danke an alle.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Aussagen und Gedanken wurden in der Dissertationsschrift als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit auch, dass die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.



Maria Bretschneider

Steinberg, den 08.09.2016

Ort, Datum

Zur Person

▪ Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Maria Ilona Bretschneider
Geburtstag und -ort:	08.Oktober 1985 in Schlema
Früherer Familienname:	Döhler
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Kinder:	Helena (Jan. 2011); Theodor (Dez. 2014)

Werdegang

Dez. 2014 - heute	Elternzeit
Okt. 2010 – Okt. 2014	<p>Promotionsstipendium der DFG im Rahmen des Graduierten-Kollegs <i>GRK 1591</i></p> <p>Anfertigung der Promotion am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Betreuung von Jun.-Prof. C. Grossmann und Prof. M. Gekle</p> <p>Thema der Dissertation: „MiR-29b in der Aldosteron-induzierten Pathophysiologie glatter Gefäßmuskelzellen“</p>
Jan. 2011 – Nov. 2011	Elternzeit

- Okt. 2005 – Sept. 2010 Biochemie-Studium der an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Abschluss: Diplom-Biochemiker
- Vertiefungsrichtung: medizinische Biochemie
- Diplom-Gesamtnote: 1,4 (sehr gut)
- Diplomarbeit angefertigt am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Betreuung von Prof. M. Gekle
- Titel: „Bedeutung des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) für die Signaltransduktion vasoaktiver Substanzen in aortalen, glatten Muskelzellen aus Mäusen“
- Aug. 2004 - Sept. 2005 Au Pair-Aufenthalt in Boston (MA), USA
- Teilnahme am Kurs *Biochemistry* der Harvard University, Cambridge
- 1996 - 2004 Johann-Heinrich-Pestalozzi Gymnasium Rodewisch
- Abschluss 12. Klasse : Abitur
- 1992 - 1996 Grundschule Eibenstock

- **Publikationen**

Bretschneider M, Busch B, Mueller D, Nolze A, Schreier B, Gekle M and Grossmann C. Activated mineralocorticoid receptor regulates micro-RNA-29b in vascular smooth muscle cells. *The FASEB Journal*, 2016

Gekle M, **Bretschneider M**, Meinel S, Ruhs S, Grossmann C. Rapid mineralocorticoid receptor trafficking. *Steroids*, 2014

Schreier B, Rabe S, Schneider B, **Bretschneider M**, Rupp S, Ruhs S, Neumann J, Rueckschloss U, Sibilica M, Gotthardt M, Grossmann C, Gekle M. Loss of epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes causes arterial hypotension and cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 2013

Schreier B, **Döhler M**, Rabe S, Schneider B, Schwerdt G, Ruhs S, Sibilica M, Gotthardt M, Gekle M, Grossmann C. Consequences of epidermal growth factor receptor (ErbB1) loss for vascular smooth muscle cells from mice with targeted deletion of ErbB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2011

- **Öffentliche Vorträge**

New Aldosterone-Dependent Signaling Pathways Associated with Vascular Aging. Geriatrie und Gerontologie Kongress, Halle (Saale), September 2014

The potential role of miR-29b in aldosterone-induced vascular smooth muscle cell pathophysiology. Kongress der deutschen physiologischen Gesellschaft, Mainz, März 2014

The potential role of miR-29b in aldosterone-induced vascular smooth muscle cell pathophysiology. Evaluierung des Graduiertenkollegs 1591 der DFG, Halle (Saale), Februar 2014

The potential role of miR-29b in aldosterone-induced vascular smooth muscle cell pathophysiology. ESAC Kongress, Paris, Dezember 2013

- **Posterpräsentationen**

MiR-29b in Aldosterone-induced Vascular Smooth Muscle Cell Pathophysiology. Kongress für *Mechanisms of cardiovascular diseases and the road to therapy – a dialogue between basic and translational science*, Hannover, September 2014

The potential role of miR-29b in aldosterone-induced vascular smooth muscle cell pathophysiology. Evaluierung des Graduiertenkollegs 1591 der DFG, Halle (Saale), Februar 2014

Mineralocorticoid receptor-dependent regulation of microRNA-29b expression in vascular smooth muscle cells. Kongress der deutschen physiologischen Gesellschaft, Heidelberg, März 2013

Search for mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-regulated microRNAs in primary human endothelial cells, Internationales Meeting des GRK1591, Halle (Saale), März 2012

Investigation of cortico-steroid receptor-dependent changes in miRNA expression in primary human endothelial and vascular smooth muscle cells. Kongress der deutschen physiologischen Gesellschaft, Dresden, März 2012