

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

**Einfluss des Mineralokortikoidrezeptors und Glukokortikoidrezeptors
auf die MicroRNA-Expression
in humanen aortalen Endothelzellen in Primärkultur**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr.med.)

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

von Franziska Neid

geboren am 08.11.1988 in Naumburg

Gutachter/Gutachterin:

1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claudia Großmann
2. PD Dr. med. Alexander Zipprich
3. Prof. Dr. med. Susanne Rohrbach

16.02.2016

30.09.2016

Referat

Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) ist in die Salz- und Wasserhomöostase involviert und entscheidend an der Blutdruckregulation beteiligt. Auf der anderen Seite kann er aber auch pathophysiologische Effekte auf das renokardiovaskuläre System ausüben und hier zu Entzündung, Fibrose und Remodelling/Umbauprozessen führen. Der genaue Mechanismus hierfür ist unbekannt. Obwohl der MR sowie der nah verwandte Glukokortikoidrezeptor (GR) als Liganden-gebundene Transkriptionsfaktoren am gleichen Hormon-responsiven-Element agieren, haben sie aus noch unklarer Ursache ganz unterschiedliche Funktionen im Körper. Eine mögliche Erklärung für die pathophysiologischen MR-Effekte und die MR-Spezifität ist die posttranskriptionelle Regulation von Genen, möglicherweise über Modulation der MicroRNA-Expression. MicroRNAs sind kleine, ca. 22-Nukleotid-lange, nichtkodierende RNAs, die an die 3'UTR Region von bestimmten mRNAs binden und damit zu einem Abbau bzw. einer Inhibierung der Translation dieser mRNAs führen.

Um diese Hypothese zu testen, untersuchten wir das basale MicroRNA-Expressionsprofil in humanen aortalen Endothelzellen (HAoEC), da Endothelzellen eine relevante Rolle in der Pathophysiologie der MR-Effekte spielen. Weiterhin prüften wir, ob bei Aktivierung des MRs mit seinem Liganden Aldosteron bzw. bei Aktivierung des GRs mit Dexamethason sich das basale Expressionsprofil der MicroRNAs ändert. Dabei verwendeten wir MicroRNA-Microarrays als Screeningtest, um etwaige MicroRNAs zu finden, die durch den MR bzw. den GR reguliert werden. Diese Ergebnisse validierten wir mittels RT-PCR-Untersuchungen. Dabei filterten wir aus einem Pool von über 1000 analysierbaren MicroRNAs (MIRBase Version 12) die HSA-MIR-2278, als durch den MR regulierten Vertreter heraus. Mittels bioinformatischer Analysen konnten wir etwaige Zielgene ausmachen. Zukünftig soll diese MicroRNA funktionell näher untersucht werden, als auch deren Zielstrukturen, um eventuell weitere Einblicke in den Mechanismus der MR-spezifischen Pathologie zu erlangen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. Der Mineralokortikoidrezeptor	1
1.1.1. Struktur von Gen und Protein	1
1.1.2. Vorkommen und physiologische Funktion	2
1.1.3. Pathophysiologie	4
1.2. Der Glukokortikoidrezeptor	5
1.2.1. Struktur von Gen und Protein	5
1.2.2. Vorkommen und physiologische Funktion	6
1.2.3. Pathophysiologie	7
1.3. Verschiedene Aspekte der MR- und GR-Selektivität	7
1.4. MicroRNA	8
1.4.1. Definition	8
1.4.2. MicroRNA-Biogenese	9
1.4.3. Mechanismen der Genregulation	11
1.4.4. Kardiovaskuläre MicroRNAs	12
1.4.5. Bedeutsame vaskuläre MicroRNAs	12
1.4.6. MicroRNA-induzierte MR- und GR-Regulation	13
1.5. Zielsetzung der Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Zellkultur	16
2.1.1. Humane aortale Endothelzellen in Primärkultur	16
2.1.2. Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293)	16
2.1.3. Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (EA.hy 926)	16
2.1.4. Transiente Transfektion	17
2.1.5. Transfektion mit MicroRNA-Mimics	17
2.2. Molekularbiologische Methoden	17
2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA	17
	III

2.2.2. Konzentrationsbestimmung der RNA	17
2.2.3. DNA-Elektrophorese	18
2.2.4. MicroRNA-MicroArray Analysen	18
2.2.5. RT-PCR	19
2.2.6. Herstellung des pMIR-2278-Luc-Reporters	23
2.3. Reporter-Gen-Assays	26
2.3.1. Luciferase Reporter-Gen-Assay mit dem pMIR-Luc TM Reporter Vektor	26
2.4. Proteinbiochemische Methoden	28
2.4.1. Herstellung von Zelllysaten	28
2.4.2. Proteingehaltsbestimmung	28
2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.4.4. Western Blot	29
2.5. Bioinformatik	30
2.6. Statistik	30
3. ERGEBNISSE	31
3.1. MR-Nachweis in HAoEC	31
3.1.1. MR-Nachweis über RT-PCR	31
3.1.2. MR-Nachweis über Western Blot	31
3.2. GR-Nachweis in HAoEC	32
3.2.1. GR-Nachweis über RT-PCR	33
3.2.2. GR-Nachweis über Western Blot	33
3.3. Vermehrte Expression des MR unter Inkubation mit Aldosteron	34
3.3.1. MR-Expression in der RT-PCR	34
3.3.2. Expression des MR unter Stimulierung mit Canrenoat/Aldosteron in der RT-PCR	35
3.4. GR-Expression bei Inkubation mit Aldosteron	35
3.4.1. GR-Expression in der RT-PCR	35
3.5. Analyse der MicroRNA-MicroArray-Daten	36
3.5.1. Darstellung einer allgemeinen Gesamtanalyse der MicroRNA-MicroArray-Daten	37
3.5.2. Darstellung eines basal exprimierten MicroRNA-Expressionsprofil in den HAoECs	38
3.5.3. Darstellung nachweisbarer MicroRNAs unter Stimulation mit Aldo oder Dexa	39
3.5.4. Validierung der regulierten MicroRNAs	40
3.5.5. Untersuchung der MIR-2278-Regulation in Reporter-Genanalysen	47
	IV

3.5.6. Bioinformatische Targetsuche der MIR-2278	49
4. DISKUSSION	50
4.1. Aldosteron-induzierte MR-Expression in HAoECs	50
4.2. Die Bedeutung des basalen MicroRNA-Expressionsprofils der HAoECs	52
4.3. Regulation der MicroRNA-Expression durch den MR und GR in HAoECs	54
4.4. Die Bedeutung der MIR-2278 in HAoECs	58
4.5. Bewertung der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zur MicroRNA-Expression	61
5. ZUSAMMENFASSUNG	64
6. LITERATURVERZEICHNIS	66
7. TABELLENANHANG	73
8. THESEN	76
LEBENS LAUF	78
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG UND ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE DISSERTATIONSVERSUCHE	80
DANKSAGUNG	81

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'Untranslated Region
11 β -HSDH1	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1
11 β -HSDH2	11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2
ACE	Angiotensin I converting Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropic Hormone
AF1a	Activation Function Domain 1a
AF1b	Activation Function Domain 1b
AF2	Activation Function Domain 2
AGO	Argonaute
Aldo	Aldosterone
ANF	Atrial natriuretic Factor
AP-1	Activator Protein-1
AP-2	Activator Protein-2
AR	Androgen Receptor
BNP	Brain natriuretic Peptide
Ca ²⁺	Calcium Ion
CHIF	Channel inducing Factor
Cl ⁻	Chloride Ion
CRH	Corticotropin releasing Hormone
CSF-1	Colony stimulating Factor 1
cSrc	Cellular Sarcoma

DBD	DNA binding Domain
Dexa	Dexamethasone
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGFP	Enhanced green fluorescent Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELL	Elongation Factor eleven nineteen Lysine rich Leukemia
ENaC	Epithelial Sodium Channel
eNOS	Endothelial NO Synthase
EPHESUS	Eplerenone post acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study
ER- α	Estrogen α Receptor
ET-1	Endothelin-1
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GILZ	Glucocorticoid induced Leucine Zipper
G6PDH	Glucose 6 Phosphate Dehydrogenase
GR	Glucocorticoid Receptor
GRE	Glucocorticoid Response Element
H ⁺	Hydrogen Ion
HDAC	Histon Diacetylase
HEK	Human embryonic Kidney Cells
HRE	Hormone Response Element
HSP90	Heat Shock Protein 90 kDA

HAoECs	Human aortic endothelial Cells
HUVEC	Human umbilical Vein endothelial Cells
IFN- β	Interferon- β
K ⁺	Potassium Ion
KCa1.1	Calcium activates Potassium Channel Subunit α 1
K-ras2	Kirsten Rat Sarcoma viral Oncogene Homolog
LBD	Ligand binding Domain
MAPK	Mitogen activated Protein Kinase
MIR	MicroRNA
MR	Mineralocorticoid Receptor
mRNA	Messenger RNA
Na ⁺	Sodium Ion
NaCl	Sodium Chloride
NAPDH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF κ B	Nuclear Factor kappa β
NLS	Nuclear Localization Signal
NO	Nitric Oxide
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1
NR3C2	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2
n.s.	nicht signifikant
NTD	N-terminal Domain
P1	Promoter 1
P2	Promoter 2

p27 ^{kip1}	Cyclin dependent Kinase Inhibitor 1B
PAI-1	Plasminogen Activator-Inhibitor-1
PDGF	Platelet derived Growth Factor
PKC ϵ	Protein Kinase C, epsilon
PR	Progesterone Receptor
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RAAS	Renin Angiotensin Aldosterone Systeme
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
RISC	RNA inducing silencing Complex
RNA	Ribonucleic Acid
ROMK	Renal outer medullary Potassium Channel
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real Time- Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SGK1	Serum/Glucocorticoid regulated Kinase 1
siRNA	Small interfering RNA
SP1	Specificity Protein 1
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
UPAR	Urokinase Plasminogen Activator Surface Receptor
UCP1	Mitochondrial brown Fat uncoupling Protein 1
UCP3	Mitochondrial brown Fat uncoupling Protein 3
VSMC	Vascular smooth Muscle Cells

VEGF Vascular endothelial Growth Factor

ZNS Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Der Mineralokortikoidrezeptor

1.1.1. Struktur von Gen und Protein

Der Mineralokortikoidrezeptor gehört zur Subfamilie einer aus 49 Vertretern bestehenden Steroid/Thyreoid/Retinoid/Orphan-Rezeptor-Familie von nukleären Rezeptoren (Kassahn et al., 2011). Zu dieser Subfamilie gehören neben dem Mineralokortikoidrezeptor (MR) auch der Glukokortikoidrezeptor (GR), der Androgenrezeptor (AR), der Progesteronrezeptor (PR) und der Estrogenrezeptor (ER), die zusammen die Gruppe der Steroidrezeptoren bilden. Es wird vermutet, dass alle Rezeptoren sich evolutionär aus einem ursprünglichen Vorgängerrezeptor entwickelt haben. Dafür spricht, dass viele Sequenzhomologien innerhalb der Steroidrezeptoren bestehen. Phylogenetische Analysen weisen auf ein mögliches Modell hin. (Kassahn et al., 2011).

Das kodierende Gen für den MR (*NR3C2*) beim Menschen ist auf dem Chromosom 4 in der Region q31.1 lokalisiert und umfasst 450 kb (Morrison et al., 1990; Zennaro et al., 1995). Das Gen umfasst insgesamt 10 Exons, davon sind die ersten beiden Exons 1 α und 1 β untranslatierte Regionen. In der 5'flankierenden Region wurden 2 funktionelle Promotoren identifiziert: P1 und P2. P1 ist stärker aktiv als P2, kann aber nur von Glukokortikoiden stimuliert werden. P2 hingegen kann neben den Glukokortikoiden auch von Aldosteron aktiviert werden (Viengchareun et al., 2007). Die darauffolgenden 8 Exons kodieren für ein MR-Protein, das 984 Aminosäuren umfasst. Es existieren mindestens 2 Proteinvarianten für das MR-Gen: MR-A und MR-B (Pascual-Le Tallec et al., 2004) (siehe Abb. 1.1).

Die Proteinstruktur des MR besteht aus einer N-terminalen Domäne (NTD), einer zentralen DNA-bindenden Domäne (DBD), die über eine Scharnierregion mit einer C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne (LBD) verbunden ist (siehe Abb. 1.1). Die NTD enthält diverse funktionelle Domänen, u.a. die Liganden-unabhängige Domänen AF1a (Activation Function Domain 1a) und AF1b (Activation Function Domain 1b) (Viengchareun et al., 2007). Diese können über Rekrutierung von Kofaktoren modulierend auf die transkriptionelle Aktivität wirken. Die Zinkfingerstruktur der DBD ist zum einen verantwortlich für die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, wie die Hormon-responsiven-Elemente (HRE). Zum anderen erleichtert sie die Dimerisierung des Rezeptors. Die LBD enthält die Domäne AF2 (Activation Function Domain 2), die die liganden-abhängige Transkriptionsaktivität vermittelt.

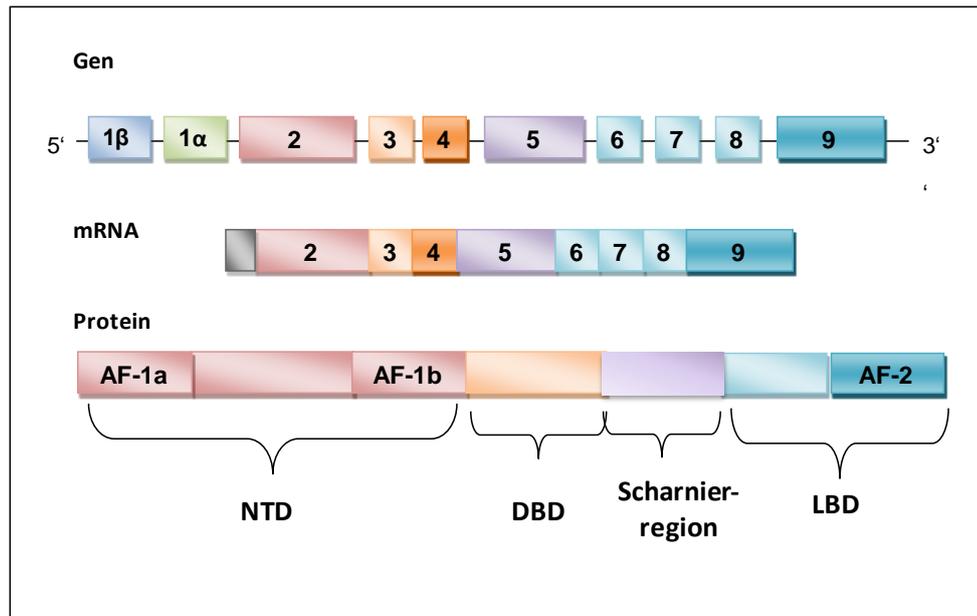


Abbildung 1.1: Darstellung des MR-Gens und der Struktur des MR auf mRNA- und Protein-Ebene; modifiziert nach Viengchareun et al., 2007

1.1.2. Vorkommen und physiologische Funktion

Der Mineralokortikoidrezeptor und sein endogener Ligand Aldosteron spielen beim Menschen eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes und der damit verbundenen Blutdruckregulierung. Aldosteron wird hauptsächlich von der Zona glomerulosa in der Nebennierenrinde produziert. Andere Untersuchungen deuten hingegen darauf hin, dass die Biosynthese von Aldosteron in sehr geringem Umfang auch in anderen Geweben stattfindet, wie dem kardiovaskulären (Cachofeiro et al., 2008; Struthers, 2004; Takeda et al., 2000) und dem zentralnervösen System (Connell et al., 2008). Die klassischen Gewebe, in denen der MR exprimiert wird, sind die epithelialen Gewebe in den Nieren, dem Kolon, sowie den Speicheldrüsen und Schweißdrüsen. Des Weiteren wird der MR auch in vielen weiteren Geweben exprimiert, z.B. in dem kardiovaskulären Gewebe, Fettgewebe oder im ZNS (Rogerson et al., 2004).

In Abwesenheit des Liganden liegt der MR im Zytosol vor, gebunden an einen Multiproteinkomplex, der u.a. aus einem Chaperon (HSP90) besteht (Binart et al., 1991; Lombes et al., 1994a). Nach Ligandenbindung dissoziiert der MR von seinen assoziierten Proteinen ab und transloziert in den Kern. Im Kern bindet der MR als Homodimer an ein Hormon-responsives-Element (HRE). Mit seiner Wirkung als Transkriptionsfaktor ist er in der Lage, die Expression von bestimmten Zielgenen zu steigern bzw. zu verringern. Zu den wesentlich durch den MR

regulierten Genen gehören die Na⁺-K⁺-ATPase, der epitheliale Na⁺-Kanal ENaC und die Serin/Threonin-Kinase SGK1, der Kaliumkanal ROMK und der Kalzium-Kanal KCa1.1 (Pascual-Le Tallec and Lombes, 2005; Viengchareun et al., 2007). Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die MR-Zielgene mit deren Funktion, sowohl in den klassischen epithelialen Geweben, als auch in den nicht-epithelialen Geweben. Neben den genomischen Wirkungen sind auch nicht-genomische Signalwege bekannt, in die u.a. PKCε, cSrc, und der EGFR involviert sind (Gekle and Grossmann, 2009). Physiologischerweise führt der MR in den epithelialen Geweben zu einer verbesserten Na⁺-, Cl⁻-Resorption und einer vermehrten H⁺- und K⁺-Sekretion, gefolgt von einer H₂O-Retention. Damit wird das Extrazellulärvolumen reguliert und der Organismus vor einer kritischen arteriellen Hypotonie und einer gefährlichen Kaliumentgleisung geschützt. Dies ist z.B. entscheidend für die Elektrophysiologie im kardiovaskulären System. Die MR-Expression im ZNS (Hippocampus, Nucleus Tractus solitarius, Hypothalamus) hat ebenfalls Anteil an der Regulierung des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes sowie der Blutdruckregulation. Über Veränderung des Sympathikotonus moduliert der MR die Reninausschüttung und den Sollwert des Barorezeptorreflexes (Gekle and Grossmann, 2009; Pascual-Le Tallec and Lombes, 2005).

Tabelle 1.1: Auswahl von Zielgenen des MR und ihre biologische Funktion, modifiziert nach Viengchareun et al. 2007

Target-Gen	Gewebe	Funktion	Referenz
αENaC-Untereinheit	Niere, Innenohr	Na ⁺ -Transport	(Bens et al., 1999; Masilamani et al., 1999)
β/γENaC-Untereinheit	Kolon	Na ⁺ -Transport	(Epple et al., 2000)
α1/β1 Na ⁺ -K ⁺ -ATPase-Untereinheit	Niere, Kolon	Na ⁺ -Transport	(Kolla and Litwack, 2000)
CHIF	Niere, Kolon	Na ⁺ -Transport	(Brennan and Fuller, 1999; Wald et al., 1996)
K-ras2	Kolon	nicht vollständig geklärt	(Brennan and Fuller, 2006)
ELL	Niere	Elongationsfaktor	(Pascual-Le Tallec et al., 2005)
SGK1	Niere, Kolon	Na ⁺ -Transport; Nedd-4-2-Phosphorylierung; ENaC-Regulierung	(Bhargava et al., 2001; Chen et al., 1999; Naray-Fejes-Toth et al., 1999)
GILZ	Niere	Na ⁺ -Transport; Inhibierung der ERK-Kaskade	(Soundararajan et al., 2005)
ET-1	Niere, Kolon	Vasokonstriktion	(Wong et al., 2007)

PAI-1	Niere	Initiierung der Glomerulosklerose	(Yuan et al., 2007)
Osteopontin	aortales Endothel	Inflammation und Fibrose	(Sugiyama et al., 2005a)
ACE	aortales Endothel	endotheliale Dysfunktion; vaskuläre Schäden	(Sugiyama et al., 2005b)
MDM2	glatte Muskulatur	Zellproliferation	(Nakamura et al., 2006)
EGFR	glatte Muskulatur	Fibronectin-Hochregulation	(Grossmann et al., 2007)
Kollagen I,III, IV	kardiale und renale Fibroblasten	myokardiale Fibrose ; tubulointerstitielle Fibrose	(Brilla et al., 1994; Nagai et al., 2005)
G6PDH	koronararterielles Endothel	Verbesserung der vaskulären Reaktivität	(Leopold et al., 2007)
UPAR	Herz	kardiales Remodelling	(Fejes-Toth and Naray-Fejes-Toth, 2007)
UCP1, UCP3	braune Adipozyten	Thermogenese	(Viengchareun et al., 2001)

1.1.3. Pathophysiologie

Die RALES- und EPHEBUS-Studie in den Jahren 1999 und 2003 lenkten den Blick auf die Untersuchung von pathophysiologischen Vorgängen des MR. In der RALES-Studie wurde gezeigt, dass unter Therapie mit MR-Antagonisten die Morbidität und Mortalität von herzinsuffizienten Patienten gesenkt werden kann (Pitt et al., 1999). Ähnlich konnte in der EPHEBUS-Studie eine Verbesserung durch MR-Antagonisten bei Patienten mit Myokardinfarkt und komplizierender Linksherzdysfunktion gezeigt werden (Pitt, 2004). In den folgenden Jahre wurden viele Untersuchungen im Hinblick auf diese Problematik getätigt und es konnte festgestellt werden, dass der MR an inflammatorischen, fibrotischen und remodelierenden Prozessen im renokardiovaskulären System beteiligt ist (Delcayre and Swynghedauw, 2002; Gekle and Grossmann, 2009; Nagai et al., 2005; Pitt, 2004) (siehe Abb. 1.2). Die den pathophysiologischen Mechanismen zugrunde liegenden Prozesse sind bisher ungenügend erforscht. Damit der MR seine pathophysiologischen Effekte entwickeln kann, genügt allerdings nicht eine vermehrte Aktivierung durch pathologische Konzentrationen von Aldosteron (Gekle and Grossmann, 2009). Hierfür muss zusätzlich ein bestimmtes, pathologisches Milieu vorhanden sein. Im Hinblick darauf sind verschiedene begünstigende Faktoren beschrieben: NaCl, Angiotensin II, ROS (reaktive Sauerstoffspezies) (Gekle and Grossmann, 2009).

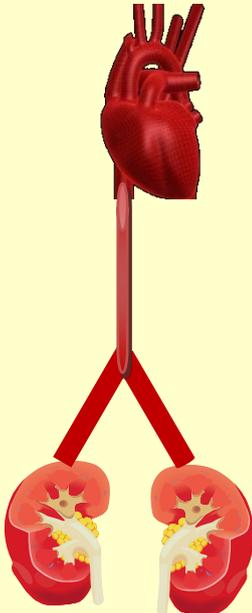
Pathophysiologie		Wichtige Mechanismen
<p><u>Kardiomyopathie:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Myokardiale Hypertrophie ❖ Fibroblastenstimulation und Fibrose ❖ Veränderte Kanalaktivitäten und Aktionspotentialveränderungen ❖ Arrhythmien ❖ Inflammation 		<p><u>Vaskuläre Inflammation:</u></p> <p>Verbesserte Bildung von ROS, und inflammatorischen Zytokinen : NFκB, TGF-β, PAI-1 etc.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Rekrutierung von inflammatorischen Zellen</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Veränderte Matrixhomöostase</p>
<p><u>Vaskulopathie:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Endotheliale Dysfunktion ❖ Erhöhter Gefäßtonus ❖ Vaskuläre Inflammation ❖ Perivaskuläre Fibrose 		<p><u>Veränderte Ca²⁺- & Na⁺-Homöostase</u></p> <p>Anstieg von [Na⁺] in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Anstieg von Ca²⁺, Abnahme von NO</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">Erhöhter Gefäßtonus</p>
<p><u>Nephropathie:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Proteinurie ❖ Glomerulosklerose ❖ Tubulointerstitielle Fibrose 		

Abbildung 1.2: Überblick der pathophysiologischen Effekte von Aldosteron, modifiziert nach Gekle et al. 2009

1.2. Der Glukokortikoidrezeptor

1.2.1. Struktur von Gen und Protein

Der Glukokortikoidrezeptor (GR) gehört ebenfalls zur Subfamilie der Steroidrezeptoren (Kassahn et al., 2011). Das kodierende Gen für den GR (*NR3C1*) ist beim Menschen auf dem Chromosom 5 in der Region q31-32 lokalisiert und umfasst 140 kb (Lu and Cidlowski, 2004). Das Gen umfasst insgesamt 9 Exons.

Analog zum MR enthält auch der GR eine NTD (N-terminale-Domäne), eine DBD (DNA-bindende-Domäne) und eine LBD (Liganden-bindende-Domäne). Exon 1 enthält die 5'-untranslatierte Region. Die Promotorregion befindet sich im Exon 1. Insgesamt sind 3 unterschiedliche Promotoren beschrieben (Yudt and Cidlowski, 2002). Exon 2 umfasst kodierende Sequenzen für τ_1 , eine Transaktivierungsdomäne. Exon 3 und 4 kodieren für Zinkfinger motive und die DBD. Exon 5,6,7 und 8 enthalten Sequenzen für eine weitere Transaktivierungsdomäne τ_2 und einen großen Teil der LBD. Exon 9 kodiert für 2 alternative Carboxyl-Enden (α und β) der LBD und enthält die 3'-untranslatierte Region. Es existieren mindestens 5 GR-Isoformen, die durch Mutation, Polymorphismen und alternatives Spleißen generiert werden. Die Hauptproteinprodukte sind die GR α - und GR β -Isoform (Lu and Cidlowski, 2004).

1.2.2. Vorkommen und physiologische Funktion

Glukokortikoide modulieren ca. 10 % der humanen Gene und haben damit eine entscheidende Bedeutung in der Beeinflussung zahlreicher Vorgänge im menschlichen Körper. Sie sind beteiligt an der Regulierung von immunologischen Reaktionen, Stressantworten, Zellwachstum und Zellüberleben, vielen Stoffwechselfvorgängen und auch zerebralen Vorgängen wie Verhalten und Kognition. Die Glukokortikoide werden in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde produziert, wobei Cortisol das hauptsächlich synthetisierte Glukokortikoid beim Menschen ist. Die Synthese der Glukokortikoide unterliegt einem zirkadianen Rhythmus und wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse gesteuert. Im Hypothalamus wird das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) produziert. Über den Blutkreislauf gelangt es in die Adenohypophyse, wo es über einen spezifischen Rezeptor (CRH-Rezeptor Typ 1) die Ausschüttung von Adrenocorticotropin (ACTH) steuert. ACTH initiiert über die Bindung an den ACTH-Rezeptor die Synthese von Cortisol/Corticosteron. Der höchste Peak der Glukokortikoidproduktion wird am frühen Morgen erreicht, der niedrigste in der frühen Schlafphase (Buckingham, 2006).

Der Glukokortikoidrezeptor wird ubiquitär exprimiert und ist selektiv für Glukokortikoide. Glukokortikoide können damit sowohl an den MR, als auch an den GR binden.

Der GR liegt in seiner inaktiven Form, gebunden an einen Multiproteinkomplex (u.a. HSP90), im Zytosol vor. Bei Bindung seines Liganden ändert er seine Konformation und transloziert in den Kern. Im Kern bindet er als GR-Dimer an Hormon-responsive-Elemente, den GREs (Glucocorticoid Response Elements) und reguliert die Expression von Zielgenen. Diese GREs sind das identische Bindungselement des MR. Eine weitere Regulierung von Genen vermittelt der GR indirekt über physikalische Interaktion via Protein-Protein-Interaktion, wie z.B. mit den

proinflammatorischen Faktoren AP1 und NFκB (Pearce et al. 1993). Der GR kann somit selbst als Transkriptionsfaktor wirken, aber auch Koaktivator bzw. Korepressor anderer Transkriptionsfaktoren sein.

1.2.3. Pathophysiologie

Exogen zugeführte Glukokortikoide haben einen enormen Stellenwert in der therapeutischen Behandlung von entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis. Von endogenen Glukokortikoiden ist bekannt, dass sie durch eine Dysregulation in ihrer Sekretion und Aktivität involviert sind in die Pathologie von bestimmten Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus Typ II, dem metabolischen Syndrom, als auch bei Bluthochdruck und Depressionen (Buckingham, 2006; van Oosten et al., 2010). Erhöhte Konzentrationen von Glukokortikoiden im Körper führen zu charakteristischen Symptomen: Es kommt zu einer Umverteilung des Fettgewebes in den Stammbereich und dem typischen Vollmondgesicht und Stiernacken. Die Beeinflussung von zahlreichen Stoffwechselprozessen führt zur Muskelatrophie, Hyperglykämie, Insulinresistenz und erhöhten Cholesterin- und veränderten Lipidwerten. Ein Hypercortisolismus führt zu erhöhten Blutdruckwerten, indem Glukokortikoide die Katecholaminsensitivität erhöhen können (Dodt et al., 2009; Guaraldi and Salvatori, 2012). Des Weiteren haben sie die Fähigkeit über den MR Aldosteron-typische Effekte auszuüben. Im Vordergrund steht dabei eine erhöhte Salz- und Wasserretention mit einer damit verbundenen Hypertension (Dodt et al., 2009). Zudem können Glukokortikoide in erhöhten Konzentrationen immunsuppressiv wirken, zu Wundheilungsstörungen führen und eine Osteoporose provozieren (Dodt et al., 2009; Guaraldi and Salvatori, 2012). Auch bewirken sie endokrine Veränderungen wie Infertilität, Menstruationsunregelmäßigkeiten oder Hirsutismus. Eine Depression ist häufig assoziiert mit einer Hyperaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, bei der vor allem das CRH vermehrt ausgeschüttet wird. Dies führt wiederum zu erhöhten Cortisolwerten (Marques et al. 2009).

1.3. Verschiedene Aspekte der MR- und GR-Selektivität

Sowohl der MR als auch der GR gehören zur Familie der Steroidrezeptoren. Daher weisen sie einen hohen Grad an Sequenzhomologie und funktionellen Ähnlichkeiten auf. Jedoch bewirken sie unterschiedliche physiologische und pathophysiologische Effekte im menschlichen Körper, selbst in Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren (Pearce, 1994). Nur der MR ist an den pathophysiologischen Mechanismen im renokardiovaskulären System beteiligt und bewirkt dort eine Inflammation, Hypertrophie sowie ein Remodelling des Gewebes. An den MR bindet mit gleicher Affinität ($K_M = 0,5-2$ nM) sowohl Aldosteron, als auch Cortisol (Munier et al., 2010). Die Plasmakonzentrationen von Glukokortikoiden sind dabei physiologisch 100-1000fach höher als

die von Aldosteron (0,1-1 nM), hingegen sind Glukokortikoide vermehrt an Plasmaproteine gebunden (Farman and Rafestin-Oblin, 2001). Der MR-Aldosteron-Komplex weist hingegen eine höhere Stabilität auf als der MR-Glukokortikoid-Komplex (Lombes et al., 1994b). Es ist bekannt, dass beide Rezeptoren, Liganden-aktiviert in ihrer Funktion als nukleäre Rezeptoren, an das gleiche Hormon-responsive-Element binden: das Glukokortikoid-responsive-Element (GRE) (Funder, 1993). Unterschiedliche Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene scheinen an der MR- und GR-Selektivität beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass durch den MR, aber nicht durch den nah verwandten GR, eine erhöhte Expression des EGFR induziert wird. Dabei bindet der MR an ein individuelles MR-responsives-Element des EGFR-Promotors und kann damit pathophysiologische Effekte bewirken. Dieser Mechanismus könnte ein Ansatzpunkt sein, um die MR-Spezifität gegenüber dem GR zu erklären. Ein spezifisches Mineralokortikoid-responsives-Element konnte allerdings bisher nicht identifiziert werden (Meinel et al., 2013). Die Hormonspezifität ist u.a. auch durch den lokalen Metabolismus der 11β -HSDH2 determiniert. Diese wandelt in Zielgeweben des MR die Glukokortikoide in inaktive Formen um (Krozowski, 1999). Dieser Mechanismus ist in epithelialen Geweben wichtig für die gewebsspezifischen Effekte des MR, aber nicht alleinige Ursache der unterschiedlichen Funktionalität des MR und GR. Eine mögliche Ursache dafür ist die Interaktion der Rezeptoren mit zellspezifischen Nicht-Rezeptor-Faktoren wie z.B. Transkriptionsfaktoren, die differenzierte Transaktivierungseigenschaften bewirken können. Diese Spezifität der Interaktion von Faktoren wurde für den GR beschrieben, der durch Interaktion mit AP-1 eine Transrepression der AP-1-stimulierten Transkription bewirken kann. Dieser Effekt wurde hingegen nicht für den MR nachgewiesen (Pearce and Yamamoto, 1993). Wie genau aber diese Mechanismen der MR- und GR-Selektivität funktionieren, ist bisher nur sehr begrenzt erforscht, sodass nur Vermutungen angestellt werden können. Eine Möglichkeit, die die Selektivität erklären könnte, wäre eine Regulation über noch unbekannte MR- bzw. GR-spezifische Hormon-responsive-Elemente. Aber auch posttranskriptionelle oder posttranslationelle Modifikationen könnten eine Rolle spielen. Die posttranskriptionelle Modulation von Genen durch MicroRNAs stellt dabei einen wichtigen Ansatzpunkt in der möglichen Regulation der GR/MR-Selektivität dar.

1.4. MicroRNA

1.4.1. Definition

MicroRNAs (MIRs) sind ca. 22-Nukleotid-lange, nicht-kodierende RNAs, die eine entscheidende Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulation spielen. Auf der Grundlage bioinformatischer Analysen wird vermutet, dass ca. 20-30 % unserer menschlichen Gene durch MicroRNAs reguliert werden (Lewis et al., 2005). Bisher sind in der MIRBase Datenbank (Version 18, Stand:

November 2011) Sequenzen von 21643 reifen MicroRNAs von 168 Spezies erfasst, davon sind 2148 humanen Ursprungs (Griffiths-Jones, 2006). Über die funktionelle Rolle der meisten MicroRNAs ist wenig bekannt. Neue Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Expressionsprofil der MicroRNAs gewebs- und krankheitsspezifisch ist (Divakaran and Mann, 2008; Lagos-Quintana et al., 2002). Auch finden sich bei zahlreichen physiologischen Prozessen unterschiedlichste Expressionsmuster von MicroRNAs.

1.4.2. MicroRNA-Biogenese

Die Gene für MicroRNAs sind zum Teil evolutionär konserviert. Sie können in Introns kodierender oder nicht-kodierender Regionen bzw. in Exons lokalisiert sein. MicroRNAs haben z.T. ihre eigenen Promotoren. Es wurden einige MicroRNAs identifiziert, die in Clustern organisiert sind. Diese stehen unter gemeinsamer transkriptioneller Kontrolle. Die 22-Nukleotid-langen MicroRNAs entwickeln sich über mehrere Schritte aus diversen Vorstufen (Urbich et al., 2008). Zuerst wird die Pri-MicroRNA durch die RNA-Polymerase II (oder III) im Kern transkribiert. Dieses primäre Transkript formt sich zu einer haarnadelförmigen Schleife und kann über 1000 Nukleotide lang sein. Am 3'-Ende besitzt die Pri-MicroRNA einen Poly-A-Schwanz und am 5'-Ende einen 7-Methylguanosin-Cap. Im nächsten Schritt bindet das RNase-III-Enzym Drosha und das Doppelstrang-bindende Protein DGCR8 an die Pri-MicroRNA und generieren eine 70-100 Nukleotid-lange Pre-MicroRNA. Die Pre-MicroRNA wird durch den nukleären Exportfaktor Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert, wo sie über das RNase-III-Enzym Dicer in eine 19-25 Nukleotid-lange doppelsträngige MicroRNA zerlegt wird (Urbich et al., 2008). An dem MicroRNA-MicroRNA-Duplex bindet ein Ribonukleoproteinkomplex der Argonautprotein-Familie, die zusammen den RNA induced silencing Complex (RISC) bilden. Daraufhin wird meist der eine Strang abgebaut. Der andere Strang stellt die reife MicroRNA dar, welche gebunden an den Ribonukleoproteinkomplex in die posttranskriptionelle Regulation bestimmter Gene eingreift (Urbich et al., 2008) (siehe Abb. 1.3).

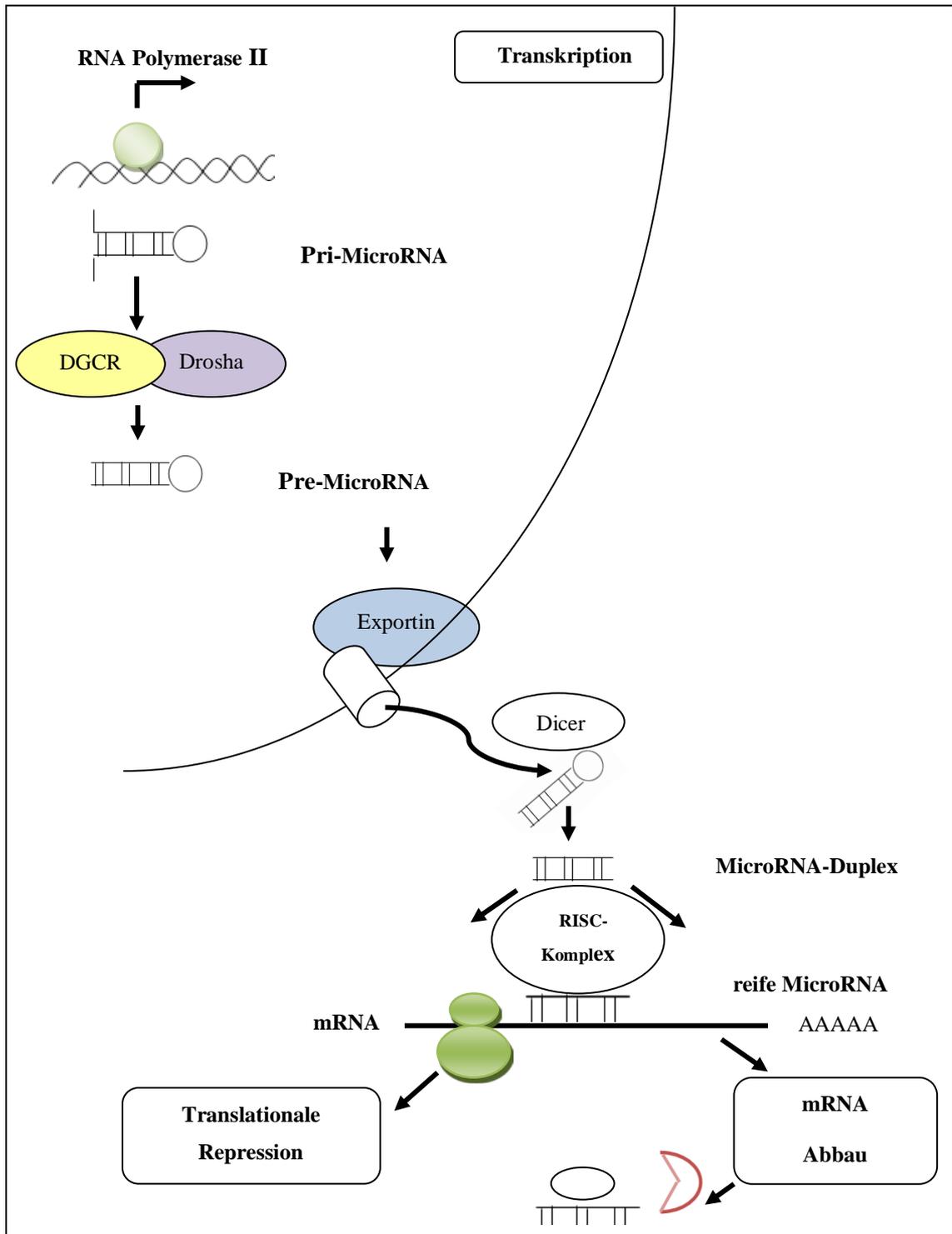


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der MicroRNA-Biogenese, modifiziert nach Urbich et al. 2008

1.4.3. Mechanismen der Genregulation

Die posttranskriptionelle Genregulation erfolgt durch Bindung der MicroRNA und des Ribonukleoproteinkomplexes an die 3'untranslatierte Region (3'UTR) bestimmter mRNA. Die MicroRNA agiert dabei als negativer Regulator der Genexpression und bewirkt daher entweder einen mRNA-Abbau bzw. eine Inhibierung der Translation. Entscheidend für die Komplementarität in der Bindung an die 3'UTR-Region sind die Nukleotide 2-8 der MicroRNA (Small and Olson, 2011). Dieser Abschnitt wird als „Seed“-Region bezeichnet. Daher werden MicroRNAs mit hoher Sequenzhomologie und identischer „Seed“-Region in bestimmte MicroRNA-Familien eingeteilt. Die MicroRNA-gesteuerte Genregulation ist komplex (siehe Abb. 1.4). Eine bestimmte MicroRNA kann an unterschiedliche 3'UTR-Regionen verschiedener mRNAs binden. Das bedeutet eine MicroRNA kann hunderte von unterschiedlichen Genen regulieren. Auf der anderen Seite binden zahlreiche verschiedene MicroRNAs an eine bestimmte 3'UTR-Region einer mRNA. Das heißt, ein Gen kann von unterschiedlichsten MicroRNAs kontrolliert werden (Small and Olson, 2011).

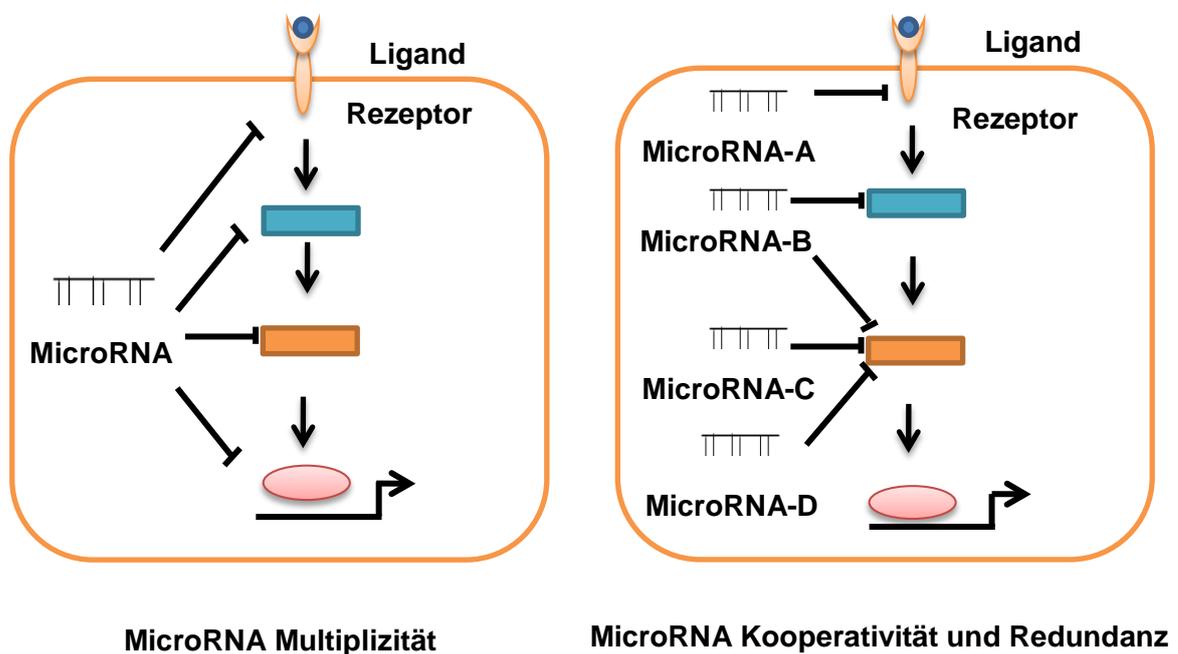


Abbildung 1.4: Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation durch MicroRNAs, modifiziert nach Small et al. 2011

1.4.4. Kardiovaskuläre MicroRNAs

Die gewebsspezifische Expression ist ein wichtiges Charakteristikum der MicroRNA-Expression (Divakaran and Mann, 2008; Lagos-Quintana et al., 2002). Bezogen auf das kardiovaskuläre System unterscheidet sich das MicroRNA-Expressionsprofil des Herzens von dem des Gefäßsystems. MIR-1, MIR-133, MIR-208, MIR-30, Let-7, MIR-126-3p werden vermehrt im Herzgewebe exprimiert, während in den Arterien die MicroRNAs MIR-145, MIR-125b, Let-7, MIR-125a, MIR-23 und MIR-143 das Expressionsprofil kennzeichnen (Cheng et al., 2007). Ferner findet sich in den Endothelzellen des Gefäßsystems ein anderes Expressionsprofil im Vergleich zu Gefäßmuskelzellen. Als Endothel-spezifische MicroRNA sei hier insbesondere die MIR-126 zu nennen (Wang et al., 2008). Einen Überblick über die im Endothel-angereicherten MicroRNAs gibt Tabelle 1.2.

MicroRNAs haben eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems, bei physiologischen Prozessen, wie der Gewebshomöostase und in der Entstehung von Krankheiten. Sie sind daher nicht nur gewebsspezifisch, sondern auch krankheitsspezifisch (Small et al., 2010; Small and Olson, 2011).

1.4.5. Bedeutsame vaskuläre MicroRNAs

Physiologischerweise modulieren bestimmte MicroRNAs vaskuläre Zellfunktionen wie Zelldifferenzierung und -Proliferation, Apoptose, Zellmigration und Angiogenese. Auf der anderen Seite gibt es auch im Gefäßsystem MicroRNAs, die als Modulatoren von pathologischen Vorgängen wirken. Ein wichtiger Mechanismus, der die Blutversorgung sowohl in der normalen Entwicklung, als auch bei krankhaften Prozessen, wie der Krebsentstehung und Atherosklerose, beeinflusst, ist die Angiogenese. Die Angiogenese ist definiert als eine Aussprossung von kleinen Blutgefäßen aus einem bereits bestehenden Kapillarsystem. Davon zu differenzieren ist die Vaskulogenese, bei der sich die Gefäße aus Endothel-Vorläuferzellen bilden. Das Endothel ist dabei der Hauptregulator der Angiogenese und ist hoch sensibel für angiogene Faktoren wie z.B. den VEGF (Vascular endothelial growth factor). Angiogene MicroRNAs fügen sich dabei in einen komplexen Regulationsmechanismus ein, dabei muss unterschieden werden zwischen pro-angiogenen MicroRNAs (MIR-126, MIR-17-92 Cluster, MIR-210, MIR-378, MIR-296) und anti-angiogenen MicroRNAs (MIR-221/222, MIR-328, MIR-15, MIR-16). In Endothelzellen sind im großen Ausmaß die spezifischen MicroRNAs Let-7b, MIR-16, MIR, 211, MIR-23a, MIR- 29, MIR-100, MIR-221 und MIR-222 sowie MIR-126 nachzuweisen.

Tabelle 1.2: Nachgewiesene MicroRNAs in humanen Endothelzellen, modifiziert nach Heusschen et al. 2010

MicroRNA	Zellen
Let-7a	HUVEC, HCAEC
Let-7b	HUVEC, HBMVEC
Let-7c	HUVEC, HCAEC
Let-7d	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-15b	HUVEC, HCAEC
MIR-16	HUVEC, HCAEC
MIR-20a	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-21	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-23a	HUVEC, HCAEC
MIR-23b	HUVEC, HBMVEC
MIR-24	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-27a	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-29a	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-30a	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-30c	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-31	HUVEC, HBMVEC
MIR-100	HUVEC, HBMVEC
MIR-103	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-106a	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-125a	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-125b	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-126	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-181a	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-191	HUVEC, HCAEC
MIR-199a	HUVEC, HCAEC
MIR-221	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-222	HUVEC, HCAEC, HBMVEC
MIR-320	HUVEC

HUVEC = Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HCAEC = Human Coronary Artery Endothelial Cells, HBMVEC = Human Brain Vascular Endothelial Cells

1.4.6. MicroRNA-induzierte MR- und GR-Regulation

Wie der MR und GR die MicroRNA Expression beeinflussen, ist Gegenstand dieser Arbeit. Es existieren bereits erste Untersuchungen dazu, welche MicroRNAs den MR und GR auf mRNA-Ebene kontrollieren. Durch Reporter-Gen-Analysen konnte funktionell gezeigt werden, dass die

MicroRNAs MIR-124 und MIR-135a in der Lage sind, den MR zu inhibieren. Dieser Effekt wirkt sich nicht auf der mRNA-Transkript-Ebene des MR aus, sondern scheint über translationelle Hemmung die MR-Proteinexpression zu beeinflussen. Die Reduzierung des MR-Proteins basiert vermutlich auf einer Interaktion der MicroRNAs mit translationellen Modulatoren wie z.B. Polyribosomen. Somit findet kein Abbau statt, sondern nur eine translationelle Repression des MR (Sober et al., 2010). Die MIR-124 spielt sowohl in der Regulation des MR als auch des GR eine Rolle. Sie ist in der Lage an die bioinformatisch- vorhergesagte „Seed“-Region in der 3'UTR-Region der GR-mRNA zu binden und die GR- Aktivität signifikant zu senken (de Kloet et al., 2009). Die MIR-124 wird in hohem Maße im Gehirn exprimiert (Landgraf et al., 2007). Sie scheint dort an wichtigen Vorgängen wie Entwicklungsprozessen beteiligt zu sein (de Kloet et al., 2009). Als weitere GR-regulierende MicroRNA ist die MIR-18a beschrieben. Im Tiermodell an Ratten wurde gezeigt, dass die MIR-18a die GR-Translation Stress-assoziiert vermindert (Uchida et al., 2008). MIR-18a ist ebenfalls an Entwicklungsprozessen im Gehirn beteiligt (Miska et al., 2004).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Der Mineralokortikoidrezeptor und der Glukokortikoidrezeptor gehören zu derselben Familie von nukleären Rezeptoren. Obwohl deren Proteinsequenzen eine starke Ähnlichkeit aufweisen und an dasselbe Hormon-responsive-Element binden, haben sie ganz unterschiedliche Wirkungen im menschlichen Körper. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind noch größtenteils unbekannt. Ein möglicher Mechanismus für eine differentielle MR-/GR-Regulation könnte die MicroRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation von Genen sein. Eine Regulation der MR- und GR-Expression durch MicroRNAs konnte für den MR und GR bereits gezeigt werden (Butterworth, 2015; de Kloet et al., 2009; Sober et al., 2010). Neuere Untersuchungen legten dar, dass auf der anderen Seite auch der MR MicroRNAs im Nierengewebe regulieren kann und damit den renalen Ionentransport moduliert (Butterworth, 2015). Das Ziel dieser Arbeit besteht nun darin zu untersuchen, ob der Mineralokortikoidrezeptor oder der Glukokortikoidrezeptor im humanen Endothelgewebe in die MicroRNA-Expression oder in den Abbau von MicroRNAs eingreifen kann. Von besonderem Interesse soll dabei sein, ob dabei bestimmte MicroRNAs induziert bzw. inhibiert werden, die eine physiologische, aber auch pathophysiologische Rolle in pathologischen Vorgängen des MR und GR spielen könnten. Des Weiteren soll eruiert werden, ob eine MR- bzw. GR-bedingte Veränderung der MicroRNA-Expression einen möglichen Erklärungsansatz in der MR-Spezifität gegenüber dem GR darstellen könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, wählten wir für unsere Untersuchungen humane aortale Endothelzellen (HAoEC), da Gefäßzellen und insbesondere Endothelzellen eine entscheidende Rolle in den pathophysiologischen Wirkungen des MR spielen. Die HAoECs sind zudem

Primärzellen, die am ehesten die Bedingungen in vivo widerspiegeln. Zunächst sollten mittels MicroRNA-MicroArrays von Miltenyi Biotec etwaige MR- bzw. GR- regulierte MicroRNA ermittelt werden, sowie ein basales Expressionsprofil der HAoECs erstellt werden. Danach sollten diese Ergebnisse mittels der RT-PCR validiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Humane aortale Endothelzellen in Primärkultur

Primäre, humane Endothelzellen aus der Aorta (HAoEC) wurden von Promocell (Heidelberg, Deutschland) erworben. Sie wurden in Endothelial Cell Growth Medium MV2 von Promocell, angereichert mit 10 % fetalem Kälberserum, bei einer Temperatur von 37 °C mit 5 % CO₂ in 75 cm² Petrischalen bis zur 95%-igen Konfluenz kultiviert. Dieses Endothelial Cell Growth Medium MV2 enthält folgende Zusätze: 5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (human rekombinant), 10 ng/ml Fibroblastenwachstumsfaktor (human rekombinant), 20 ng/ml insulinähnlicher Wachstumsfaktor (Long R3 IGF-1), 0,5 ng/ml endothelialer Wachstumsfaktor 165 (human rekombinant) und weiterhin 1 µg/ml Ascorbinsäure.

2.1.2. Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293)

Die HEK-293-Zelllinie wurde von der ATCC (American Type Culture Collection (Manassas, USA)) erworben. Kultiviert wurden sie in DMEM-Ham-F12-Medium mit 13 mM NaHCO₃, 15 mM HEPES, 5 mg/l Apo-Transferrin, 5 mg/l Insulin, 0,1 µM Hydrocortison, 10 µg/l EGF, 5 µg/l Natriumselenit und 10 % FCS bei 37°C und 5 % CO₂.

2.1.3. Humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (EA.hy 926)

Die EA.hy 926-Zelllinie wurde von ATCC (American Type Culture Collection (Manassas, USA)) erworben. Bei der EA.hy-Zelllinie handelt es sich um eine humane endotheliale Zelllinie, die durch Fusion aus der humanen Alveolarepithel-ähnlichen Lungenkarzinomzelllinie A549/8 mit HUVEC hergestellt wurde. Kultiviert wurden die Zellen in DMEM-Medium unter Zusatz von 10 % fetalem Rinderserum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Passagierung wurden die Zellen mit EDTA-Lösung (c=0,2 g/l) gewaschen und anschließend mit Trypsin (0,1 %) von der Unterlage abgelöst. Dann wurde serumhaltiges Medium hinzugegeben, um die Trypsinwirkung zu beenden. 24h vor einem Experiment wurde eine Ruhigstellung der Zellen mit serumfreiem Medium vorgenommen, um eine hormonelle Grundstimulierung zu vermeiden. Danach wurde eine Stimulierung mit Aldosteron (10 nM), Dexamethason (100 nM) oder dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kontrolle für 24h durchgeführt.

2.1.4. Transiente Transfektion

Für Luciferase-Reporter-Gen-Assays wurden EA.hy 926-Zellen auf einer 24-Well-Platte angesät und nach der Lipofektionsmethode bei 80 % Konfluenz der Zellen transfiziert. Dafür wurde das Transfektionsreagenz Fugene von der Firma Promega verwendet. Für unsere Reporter-Genanalysen der MIR-2278 wurden die Zellen mit dem vorher hergestellten Plasmid *pMIR-2278-Luc* und dem konstitutiv exprimierten Renilla-Luc-Plasmid *pGL4.74* (Promega), welches zur Normalisierung der Werte diente, transfiziert. Um die Regulation der MIR-2278 durch den MR zu untersuchen, wurde des Weiteren *pcDNA3.1-hMR* in die Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte stets in serumfreiem Medium.

2.1.5. Transfektion mit MicroRNA-Mimics

Um weitere Validierung der MIR-2278 Regulation darzulegen, wurden die EA.hy 926-Zellen in weiteren Untersuchungen zusätzlich mit MIR-2278-Mimics transfiziert. MicroRNA-Mimics sind synthetisch-hergestellte MicroRNA-Moleküle mit einer identischen Sequenz wie reife MicroRNAs. Mit dieser synthetischen MicroRNA soll die Funktion der natürlich vorkommenden MIR-2278 nach der Transfektion untersucht werden. Die MicroRNA-Mimics wurden von der Firma Life Technologie erworben. Zur negativen Kontrolle wurden zusätzlich Scramble-RNA eingesetzt. Die Mimics wurden mit Nuclease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 μM verdünnt, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte nach der sogenannten Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 2006) mit TRIzol Reagent[®] von Invitrogen. Nach Homogenisierung der Zellen mit dem TRIzol-Reagenz, erfolgte die Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation mit 11000 rpm erhält man drei Phasen: eine obere wässrige Phase, die die RNA enthält, eine DNA-enhaltende Interphase und eine untere Proteinphase. Die RNA aus der wässrigen Phase wurde anschließend mit Isopropanol präzipitiert. Danach erfolgte eine einmalige Waschung mit 75 %-igem Ethanol. Dann wurde das erhaltene Pellet in RNase-freiem Wasser gelöst und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.2. Konzentrationsbestimmung der RNA

Für die Herstellung der cDNA wurde in den Untersuchungen mit dem MiScript-System (1 μg) sowie mit dem TaqMan-System (10 ng) stets dieselbe Menge RNA verwendet. Zur Quantifizierung der RNA-Proben wurde die Konzentrationsmessung mittels eines

Spektrophotometer (NanoVue) durchgeführt. Zur Ermittlung der RNA-Konzentration wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch gemessen.

2.2.3. DNA-Elektrophorese

Die Untersuchung von DNA-Fragmenten wurde in 0,5-2 % Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern vorgenommen. Als Laufpuffer wurde 0,5-facher TAE-Puffer (aus 10-fach TAE-Stammlösung: 242 g Tris Base; 57,1 ml Eisessig; 37,2 g EDTA ad 1 l Aqua bidest) verwendet. Als DNA-Größenmarker wurde eine DNA-Leiter von Peqlab benutzt, die die DNA-Fragmente zwischen 100 bis 10000 Basenpaare charakterisiert. Die DNA-Proben wurden mit 6-fach Ladepuffer (10 mM Tris-HCl; pH 7,6; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol; 60 % Glycerin und 60 mM EDTA) verdünnt und dann in die Geltaschen des Agarosegels aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V/cm Gel durchgeführt. Danach wurde das Gel für 15 min in Aqua bidest. mit Ethidiumbromidlösung angefärbt. Dann wurde das Gel für 15 min mit Aqua bidest. gewaschen. Auf einem Transilluminator (Biometra) wurden die DNA-Fragmente durch UV-Licht detektiert und mittels einer Digitalkamera (Olympus C5050Zoom) und der Software CAM2COM dokumentiert.

2.2.4. MicroRNA-MicroArray Analysen

Die MicroRNA-MicroArray-Untersuchungen wurden von der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt. Das Verfahren ermöglicht es, die Konzentration von MicroRNAs in verschiedenen Proben zu vergleichen. Dafür wurden jeweils 3 RNA-Proben von HAoECs an Miltenyi Biotec versandt. Die Zellen wurden hierfür zuvor jeweils mit Aldosteron (10 nM) bzw. Dexamethason (100 nM) bzw. als Kontrolle mit DMSO für 24h inkubiert.

Mit ihrer miRXplore™ MicroArray Technologie analysiert Miltenyi Biotec ca. 1000 humane MicroRNAs. Der Pool an analysierbaren MicroRNAs richtete sich nach der MIRBase Datenbank Version 12.0. MicroRNA-Signale werden ab einer Konzentration von 0,5 amol ($1 \cdot 10^{-15}$ mol) detektiert. Für eine Proben-unabhängige Normalisierung und experimentelle Kontrolle verwenden sie synthetische Oligonukleotide. Dabei enthält jeder MicroArray zahlreiche Positivkontrollen, Negativkontrollen sowie Kalibrierungskontrollen und Hybridisierungskontrollen. Ein als miRXplore Universale Referenz bezeichneter Pool von synthetisch-hergestellten MicroRNAs wird als interne Referenz benutzt, um unterschiedliche Proben miteinander vergleichen zu können. Für die MicroArrays wird eine 2-Farben-Hybridisierung vorgenommen, dabei werden je 5 µg totale RNA der zu analysierenden Probe sowie 5 µg der Universalen Referenz mit den synthetischen Fluoreszenzmolekülen Hy5 oder Hy3 markiert. Das Probenmaterial und die Universale Referenz werden dann individuell analysiert. Aus diesen beiden Ergebnissen ergibt sich ein Quotient (=Ratio). Durch die Bildung von Ratios,

können die Werte von verschiedenen RNA-Proben pro MicroRNA untereinander verglichen werden. Zur Analyse der Stimulierbarkeit der MicroRNAs durch Aldosteron bzw. Dexamethason wurden zusätzlich ReRatios berechnet (siehe Abb. 2.1):

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Probe x}}{\text{Universale Referenz}}$$

$$\text{ReRatio} = \frac{\frac{\text{Probe x}}{\text{Universale Referenz}}}{\frac{\text{Kontrolle}}{\text{Universale Referenz}}}$$

Abbildung 2.1: Prinzip der Ratio- und ReRatio-Ermittlung nach Miltenyi Biotec

2.2.5. RT-PCR

(a) RT-PCR für MR und GR

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde das SuperScript Kit von Invitrogen verwendet. Der DNase-Verdau erfolgte mit DNase I (2000 U/ml) und dem dazugehörigen DNase I Buffer (10-fach) von NEB. Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt (siehe Tabelle 2.1):

Tabelle 2.1. Typisches Pipettierschema für SuperScript Kit von Invitrogen

Reagenz	Volumen
First strand buffer 5x	4 µl
DTT 100 mM	0,25 µl
DNTPs 10 mM	1 µl
RNase Out 40U/µl	0,5 µl
Random Primer 0,3µg/µl	0,07 µl
Reverse Transkriptase 200 U/µl	0,25 µl
RNA 1µg	
RNase-freies Wasser	Ad 25 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Für die Real-Time PCR wurden der Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix von Invitrogen eingesetzt (siehe Tabelle 2.2):

Tabelle 2.2: Typisches Pipettierschema für RT-PCR

Reagenz	Volumen
2x SuperMix	12,5 µl
sense Primer 10 pmol/µl	1 µl
antisense Primer 10 pmol/µl	1 µl
cDNA (Template)	2 µl
Rox Farbstoff	0,05 µl
RNase-freies Wasser	8,45 µl

Die für die PCR verwendeten Primer sind in folgender Tabelle 2.3 aufgeführt:

Tabelle 2.3: Verwendete Primer für RT-PCR

Nachweis	Primer (Sense)	Primer (Antisense)	Reaktionsbedingungen
MR-Intron	5'ATCACGATCGGCTAG AGACC	5'CCCATA ATGGCATCCTGAAG	58 °C
GR-Intron	5'-AGGTGC CAGAACATTTCTCTA	5' -AACACG CAGATGCAGTCG	58°C
hu18s- rRNA	5'-GCATAT GCTTGTCTCAAAGA	5'- CCAAAG GAACCATAACTGAT	55°C

(b) RT-PCR für MicroRNA mit MiScript

Für die RT-PCR zur MicroRNA-Untersuchung wurde das MiScript SYBR Green PCR Kit von Qiagen verwendet. Der DNase-Verdau erfolgte mit DNase I (2000 U/ml) und dem dazugehörigen DNase I Buffer (10-fach) von NEB. Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt (siehe Tabelle 2.4):

Tabelle 2.4: Typisches Pipettierschema mit MiScript Kit von Qiagen für Reverse Transkription

Reagenz	Volumen
MiScript RT Buffer 5x	4 µl
MiScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
RNase-freies Wasser	ad 20 µl
RNA 1 µg	
Gesamtvolumen	20 µl

Für die RT-PCR wurden folgende Reagenzien eingesetzt (siehe Tabelle 2.5):

Tabelle 2.5: Typisches Pipettierschema für RT-PCR

Reagenz	Volumen
QuantiTect SYBR Green PCR MM 2x	5 µl
MiScript Universal Primer 10x	1 µl
MiScript Primer10x	1 µl
RNase-freies Wasser	4 µl
cDNA (= template)	1 µl

Die für die qPCR verwendeten Primer sind in folgender Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Primer für RT-PCR

Nachweis	Sequenz	Reaktionsbedingungen
HSA-MIR-21	5'-CGG TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A	Anlagerungstemperatur: 58 °C; Zyklen: 45 ; Produktgröße 25 bp
HSA-MIR-23b	5'-ATC ACA TTG CCA GGG ATT ACC	Anlagerungstemperatur: 58 °C Zyklen: 45 Produktgröße: 21 bp
HSA-MIR-29b	5'TAG CAC CAT TTG AAA TCA GTG TT	Anlagerungstemperatur: 58 °C Zyklen: 45 Produktgröße: 23 bp
HSA-MIR-1908	5'-CGG CGG GGA CGG CGA TTG GTC	Anlagerungstemperatur: 58 °C Zyklen: 45 Produktgröße 21 bp
HSA-MIR-449C-3p	5'TTG CTA GTT GCA CTC CTC TCT GT	Anlagerungstemperatur 60 °C, Zyklen: 40, Produktgröße: 23 bp
HSA-MIR-2278	5'GAG AGC AGT GTG TGT TGC CTG G	Anlagerungstemperatur 60 °C, Zyklen: 40, Produktgröße: 22 bp

(c) RT-PCR für MicroRNA mit TaqMan

Für die RT-PCR wurde neben dem MiScript Kit von Qiagen das spezifischere System der TaqMan™ Technologie von Applied Biosystems verwendet. Dabei wurde bei der Reversen Transkription mit einem MicroRNA-spezifischen Looped Primer gearbeitet. Für die qPCR wird neben einem spezifischen Forward-Primer, eine spezifische TaqMan-Sonde verwendet. Diese TaqMan-Sonden tragen am 5' Ende einen Reporterfarbstoff und am 3' Ende einen Quencher-Farbstoff, dieser kann die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) abfangen. Die TaqMan-Polymerase des PCR-Ansatzes besitzt eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und baut dann bei der Amplifikation die TaqMan-Sonden am 5'Ende ab, wobei der Reporterfarbstoff freigesetzt wird. Die Fluoreszenz kann nun nicht mehr durch den Quencher unterdrückt werden und wird messbar (siehe Abb. 2.2)

Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt (siehe Tabelle 2.7):

Tabelle 2.7: Typisches Pipettierschema für Reverse Transkription mit TaqMan von Applied Biosystems

Reagenz	Volumen
dNTPs (mit dTTP) 100 mM	0,15 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase 50 U/µl	1 µl
Reverse Transcription Buffer 10x	1,5 µl
RNase Inhibitor 20 U/µl	0,19 µl
RNase-freies Wasser	ad 15 µl
RNA 10 ng	
RT Primer	3 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Für die RT-PCR wurden folgende Reagenzien eingesetzt (siehe Tabelle 2.8):

Tabelle 2.8: Typisches Pipettierschema für RT-PCR mit TaqMan

Reagenz	Volumen
TaqMan MicroRNA Assay 20x	1 µl
cDNA (Template)	1,33 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG 2x	10 µl
RNase-freies Wasser	7,67 µl

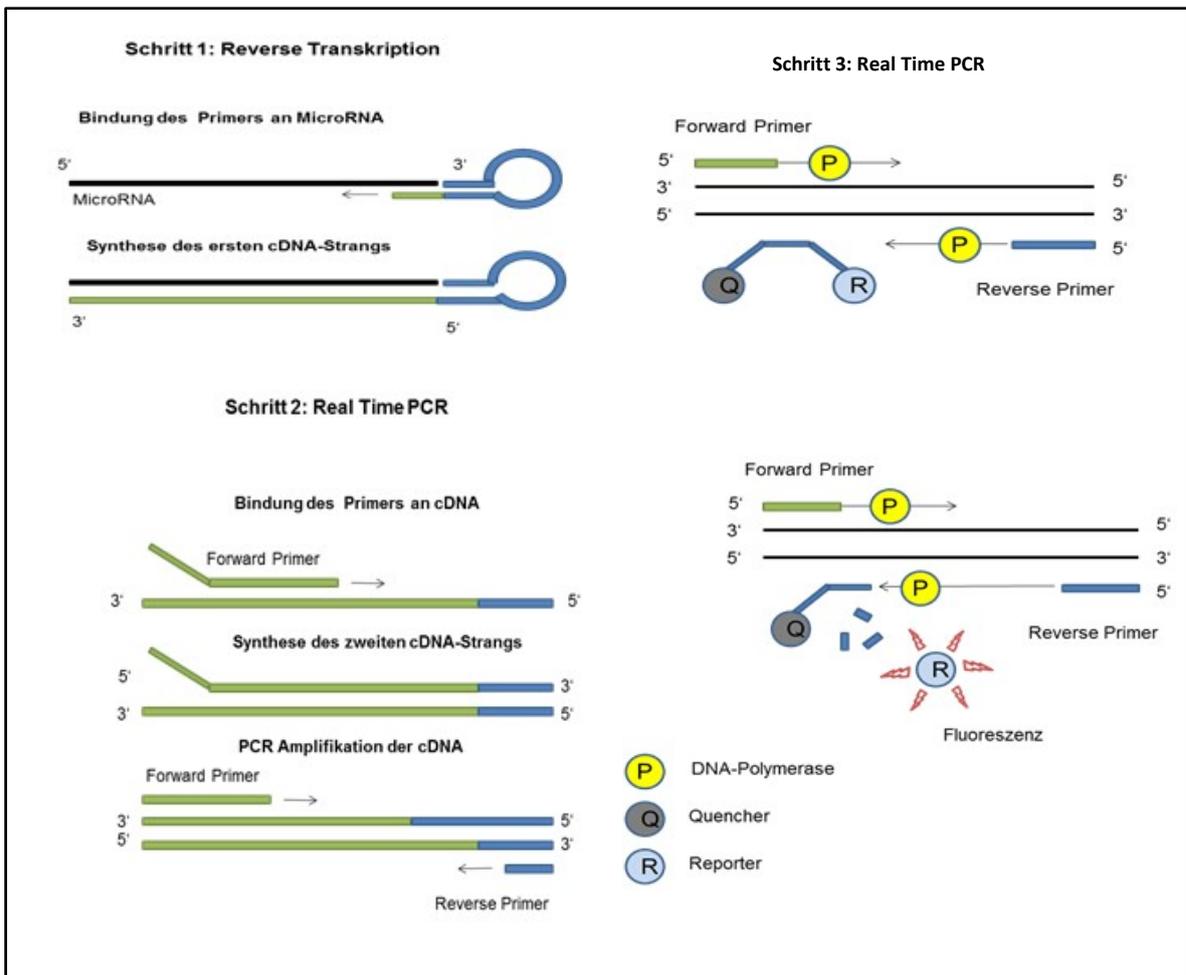


Abbildung 2.2: TaqMan Prinzip, modifiziert nach Applied Biosystems

2.2.6. Herstellung des pMIR-2278-Luc-Reporters

(a) Herstellung des Inserts

Zur Plasmidherstellung für Reportergenanalysen der MIR-2278 wurden kleine doppelsträngige Oligonukleotide mit der Sequenz der MIR-2278 Bindungsstelle sowie mit der Sequenz des komplementären Strangs davon erworben.

Oligonukleotide für MIR-2278:

MIR-2278-BS-for (Sense):	5' actagt caggcaacacacactgctctc aagctt 3'
MIR-2278-BS bac (Antisense):	5' ccaagctt agagcagtgtgttgctcctgg actagt 3'

Zunächst erfolgte eine Oligonukleotid-Hybridisierung nach folgendem Ansatz (siehe Tabelle 2.9):

Tabelle 2.9: Pipettierschema für Oligonukleotid-Hybridisierung

Reagenz	Volumen
Sense-Primer 100 pmol/ μ l	2,5 μ l
Antisense-Primer 100 pmol/ μ l	2,5 μ l
NEB-Buffer-2 10x	2,5 μ l
RNase-freies Wasser	17,5 μ l

Dieser Ansatz wurde 5 min bei 95°C erhitzt und danach langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Um 3'-A-Überhänge anzufügen, wurde dem Ansatz jeweils hinzugefügt (siehe Tabelle 2.10):

Tabelle 2.10: PCR-Ansatz zum Anhängen der dATPs

Reagenz	Volumen
PCR-Buffer 10x	5 μ l
dATPS 10mM	1 μ l
Taq-Polymerase	1 μ l

Die Auftrennung des Produktes erfolgte über ein PAGE-Gel (15 %). Es wurde ein DNA-Marker für kurze Fragmente (100 bp) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für ca. 30 min in dem PAGE-Gel. Die erhaltene Bande wurde mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben mit einer Kanüle zerkleinert und anschließend wurden die Fragmente eluiert. Hierzu erfolgte die Zugabe von 100 μ l Elutionsbuffer (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8; 50mM NaCl). Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 4-8h bei Raumtemperatur in einem Schüttler. Die Gelfragmente wurden dann durch Zentrifugieren in einer Microzentrifuge pelletiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt.

Danach erfolgte die Fällung der DNA-Fragmente aus dem erhaltenen Überstand. Dafür wurden 200 μ l des Überstandes mit 20 μ l Natriumacetat sowie mit 2,5 μ l gekühltem (100 % Vol) Ethanol vermischt und bei -20 °C in der Gefriertruhe über Nacht inkubiert, wodurch die DNA ausfällt. Danach erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 13 000 rpm bei 4 °C. Der Überstand wurde

verworfen. Das erhaltene Pellet wurde mit (70 % Vol) gekühltem Ethanol gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation im Heizblock bei 37 °C, um die restliche Flüssigkeit zu verdampfen. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden nun in 20 µl destilliertem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert. Das nun erhaltene Insert wurde für die Herstellung der Plasmide für die Reporter-Gen-Analysen genutzt.

(b) Restriktion des pMIR-Luc-Reporter-Plasmids

Zur Herstellung eines pMIR-2278-Luc Reporters (siehe Abb. 2.3) wurde zunächst ein pMIR-Luc Reporter Vektor der Firma Signosis mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *Hind III* nach folgendem Pipettieransatz geschnitten und dann in einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Tabelle 2.11):

Tabelle 2.11: Pipettieransatz zur Gelelektrophorese

Reagenz	Volumen
Plasmid (pMIR-Luc) 2µg	
SpeI 10U/µl	2µl
HindIII 10U/µl	2µl
NEB-Buffer-2 10x	5µl
RNAse-freies Wasser	ad 50 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Danach zeigte sich eine Bande bei etwa 6470 bp. Es erfolgte dann die Gelextraktion mit dem Qiaquick Gelextraktion Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben.

(c) Ligation

Danach erfolgte die Ligation des erhaltenen linearen Vektors mit dem Oligonukleotid, dafür wurde der aufgereinigte, geschnittene Vektor (100 ng) mit 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl), 1 µl T4-DNA-Ligase-Buffer (10x) sowie dem Insert (17 ng) über Nacht bei 14 °C im Thermozykler inkubiert. Das nun erhaltene Plasmid wurde in Bakterien transformiert. Hierfür wurden E.coli-Bakterien der Firma Invitrogen, sog. One-Shot-Competent-Cells verwendet.

(d) Transformation von kompetenten Bakterien

Für die Transformation wurde der Ligationsansatz zu einem 50 µl-Röhrchen der One-Shot™-Zellen pipettiert und vorsichtig vermischt. Danach erfolgte die Inkubation für 30 min auf Eis, um danach die Lösung für 30 Sekunden bei 42 °C kurz zu inkubieren und dann erneut die Lösung

auf Eis zu stellen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 250 µl SOC-Medium (2% Trypton; 0.5 % Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; and 20 mM Glucose) und eine Inkubation bei 37 °C für 1h in einem Schüttelinkubator bei 225 rpm. 20 µl und 200 µl jeder Transformation wurden auf je eine LB-Agar-Platte ausgestrichen. Diese LB-Agar-Platten enthalten das Antibiotikum Ampicillin. Die ausplattierten Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. 6 Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und in 5ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht kultiviert um anschließend Plasmide zu isolieren.

(e) Plasmidisolierung

Die Plasmide wurden mit dem Miniprep Kit von Invitex, entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der hergestellten pMIR-Luc Reporter-Plasmide erfolgte durch eine photometrische Messung. Hierbei wurde die optische Dichte der Probe bei einer Lichtwellenlängen von 260 nm gemessen. Die Messung erfolgte mit dem Spektrophotometer der Firma NanoVue.

(f) Sequenzierung

Es erfolgte eine Sequenzierung der erhaltenen Plasmide (MWG Eurofins), um die korrekte Sequenz der Klonierungsprodukte zu bestätigen.

2.3. Reporter-Gen-Assays

2.3.1. Luciferase Reporter-Gen-Assay mit dem pMIR-LucTM Reporter Vektor

In unseren Experimenten sollte der Einfluss des MR auf die MIR-2278 in EA.hy 926-Zellen untersucht werden, dafür wurde ein entsprechendes Plasmid hergestellt. Der pMIR-LucTM Reporter Vektor enthält den CMV-Promotor, das Firefly-Luciferase-Gen, eine MicroRNA-Bindungsstelle in der 3'UTR-Region und eine SV40 Endsequenz. Die MicroRNA-Bindungsstelle ist eine Sequenz, die genau komplementär zu der spezifischen MicroRNA ist. Wenn die MicroRNA exprimiert wird, bindet diese an die Sequenz und es resultiert eine verminderte Expression des Luciferase-Gens (siehe Abb. 2.3). Für unsere Analyse wurde die EA.hy926-Zellen zunächst mit dem pMIR-2278-Luc Reporter Vektor, sowie dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-hMR und dem Renilla-Luc-Plasmid *pGL4.74*, welches eine konstitutive Renillaluciferase-Aktivität aufweist, zur Normierung transfiziert. Des Weiteren wurde eine Transfektion mit MIR-2278-Mimics und entsprechenden Scramble-MIR zur Negativkontrolle vorgenommen. Für die Reporter-Genanalysen wurde das Dual Luciferase Assay der Firma Promega genutzt. Nach Transfektion der Zellen wurden diese mit DMSO oder 10 nM Aldosteron inkubiert für jeweils

24h und 48h. Danach wurden die Zellen mit dem Passive Lysis Buffer (Promega) lysiert und die Lysate in Eppendorf-Röhrchen überführt. Danach wurde jeweils 20 µl dieses Lysats sowie 100 µl des Dual Luciferase Assay Reagenz (LARII) von Promega verwendet, um die Firefly-Luciferase-Aktivität zu messen. Danach wurde 100 µl Stop-and-Glo-Reagent hinzugefügt und die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen. Die Biolumineszenz wurde mit einem entsprechenden Luminometer der Firma Berthold Technologies untersucht. Der gemessene Leerwert (untransfiziert) wurde von den Messwerten aller Proben abgezogen. Danach wurde die berechnete Lumineszenz der Firefly-Luciferase gegen die der Renilla-Luciferase normalisiert, um experimentelle Schwankungen zu minimieren.

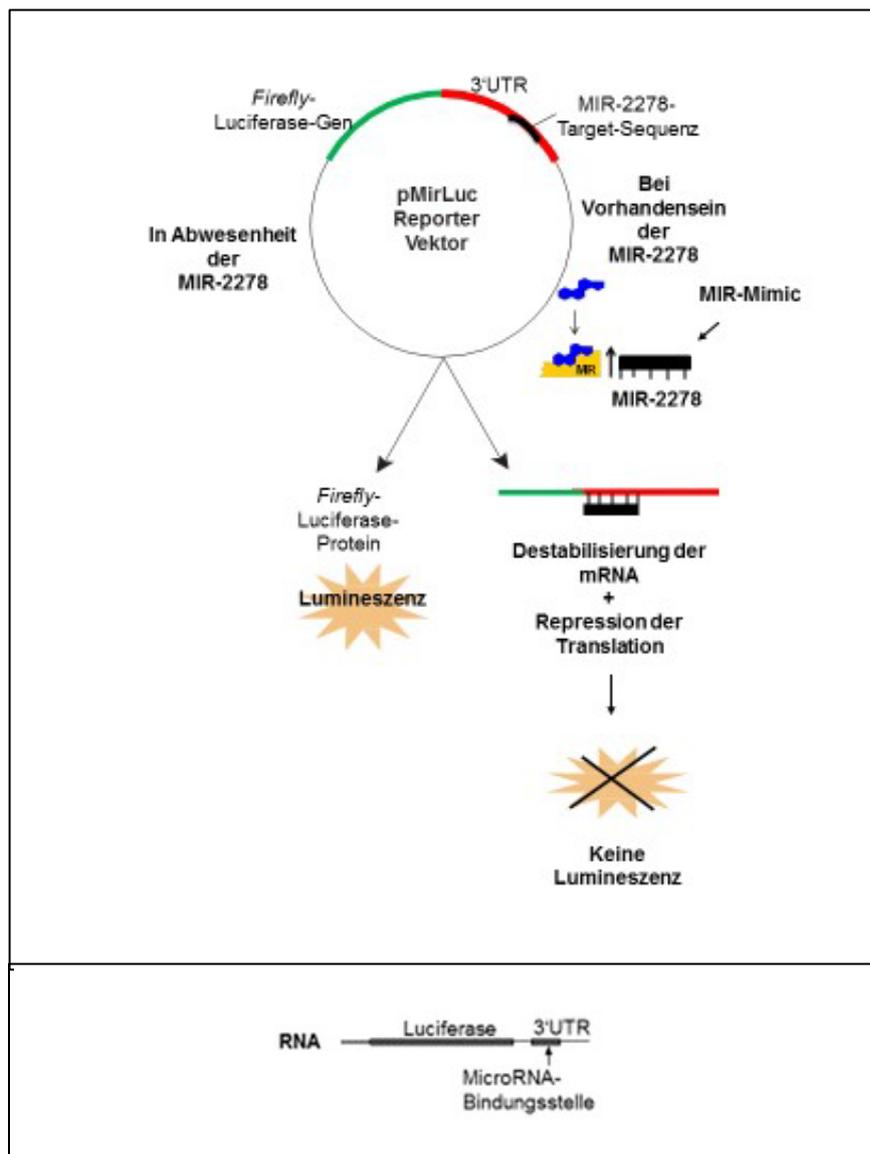


Abbildung 2.3: Prinzip des pMIR-2278-Luc Reporter Assay

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Herstellung von Zelllysaten

Für die Gewinnung von Zelllysaten wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit entsprechendem Lysepuffer (siehe Tabelle 2.12) versetzt und mit einem Zellschaber abgelöst. Danach wurde das Lysat für 30 min auf Eis inkubiert, um es dann bei 6000 rpm und 4 °C für 15 min zu zentrifugieren. Der erhaltene Überstand wurde weiter experimentell verwendet.

Tabelle 2.12: Verwendeter Lysepuffer für die Zelllysate

Lyse-Puffer	Bestandteile
RIPA-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,1 % SDS; 1% Na-Desoxycholate; 0,1 % Triton X-100; Proteaseinhibitor-Cocktail; 1mM EDTA; 184 mg/l Na-Orthovanadat; 1mM NaF

2.4.2. Proteingehaltbestimmung

Zur Proteingehaltbestimmung in den Experimenten wurde die BCA-Methode angewandt. Die BCA(Bicinchoninsäure)-Methode zur Proteingehaltbestimmung basiert auf einer photometrischen Bestimmung von Proteinen. Dabei kommt es durch die Peptidbindungen der Proteine zur Reduktion zweiwertiger Kupferionen Cu^{2+} zu einwertigen Cu^+ . Das Cu^+ bildet mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex. Zur Durchführung wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt, das aus 50 Anteilen des BCA-Reagenz (Pierce BCA Protein Assay Reagent A von Thermo Scientific) und aus einem Anteil CuSO_4 bestand. Zu einem Volumen von 2-15 μl Lysat wurden 300 μl des BCA-Reaktionsgemisches in eine Well-Platte pipettiert. Dann wurde der Ansatz bei 37 °C im Wasserbad für 30 min inkubiert. Danach wurde mit einem Mikrotiterplattenphotometer (Tecan Sunrise) die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Simultan wurde eine Eichkurve aus BSA (bovinem Serumalbumin) mit folgenden Standardverdünnungen bestimmt: 100 $\mu\text{g/ml}$; 300 $\mu\text{g/ml}$; 500 $\mu\text{g/ml}$; 700 $\mu\text{g/ml}$; 1000 $\mu\text{g/ml}$.

2.4.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Zelllysate, gemischt mit RIPA-Puffer und versetzt mit Lämmli-puffer (0,5 M Tris HCl; pH 6,8; 10 % SDS; 2-Mercaptoethanol; Glycerol; Bromphenolblau), wurden bei 37 °C im Heizblock für 30 min inkubiert. Die Proben wurden auf SDS-Page Minigelen aufgetrennt. Dabei wurden 3-%ige Sammelgele (Acrylamid 40 %; Bisacrylamid 2 %; APS 10 %; SDS 2 %; 0,5 M Tris HCl; pH 6,8; 5 M NaCl; TEMED) sowie 8-%ige SDS-Page-Trenngele (Acrylamid 40 %; Bisacrylamid 2 %; APS 10 %; SDS 2 %; 1,5 M Tris HCl, pH 8,8; 5 M NaCl; TEMED) verwendet. Die

Elektrophorese wurde im Laufpuffer durchgeführt, der sich folgendermaßen zusammensetzte: 25 mM Tris; 3,5 mM SDS; 192 mM Glycin in destilliertem Wasser.

2.4.4. Western Blot

Als Trägermembran für den Transfer beim Western Blot wurden PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen verwendet. Die Aktivierung der Membran erfolgte nach der Semidry-Methode mit einem aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzten Transferpuffer: 20% Methanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycin. Der Transfer dauerte 1,6 h. und wurde bei einem Blotstrom von 2 mA/cm² durchgeführt. Nach 5 minütigem Waschen der PVDF-Membran mit TBS (Tris-buffered Saline) erfolgte die Blockierung mit Blocking Solution (1x TBS; 0.1% Tween-20; 5 % Milchpulver) für 1h. Nach erneutem Waschen mit TBS/Tween-20 (0,1 %) wurde dann die PVDF-Membran mit dem Erstantikörper (siehe Tabelle 2.13) über Nacht bei 4°C in der Antikörperverdünnungslösung (1x TBS; 0.1 % Tween-20; 5 % BSA) inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit TBS/Tween-20 (0,1 %) wurde der Zweitantikörper (siehe Tabelle 2.13) in der Blocking Solution für 1h hinzugegeben. Nach erneuten Waschschritten mit 1x TBS und Aqua dest. wurde die Detektion durch Chemilumineszenz mit dem ECL-Reagenz (ImmunstarTMWestern CTMKit) von Biorad vorgenommen. Die Messung erfolgte im linearen Bereich.

Tabelle 2.13: Verwendete Antikörper für den Western Blot

Erstantikörper	Verdünnung	Firma
anti-MR 1-18	1:100	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa (http://dshb.biology.uiowa.edu/)
anti-GR	1:500	Santa Cruz Biotechnology

Zweitantikörper	Verdünnung	Firma
Anti-Maus-Peroxidase	1:2000	Cell Signaling
Anti-Kaninchen-Peroxidase	1:2000	Cell Signaling

2.5. Bioinformatik

Zur Auswertung wurden verschiedene im Internet zur Verfügung stehende Datenbanken sowie verschiedene Softwareprogramme genutzt.

Software: GraphPad Prism 5
 Office 2007
 Office 2015
 Sigma Plot 8.0

Datenbanken:

Allgemein: www.ncbi.nlm.nih.gov
MicroRNA: www.mirbase.org (Version 18)
 www.mirbase.org (Version 12)
 www.microrna.org
 www.mirdb.org
 www.diana.cslab.ece.ntua.gr
Genanalyse: www.ensembl.org
Proteinanalyse: www.uniprot.org

2.6. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels des Student-T-Tests überprüft. Unterschiede wurden als signifikant eingeschätzt bei einem p-Wert $\leq 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. MR-Nachweis in HAoEC

Der Einfluss des Mineralokortikoidrezeptors auf die MicroRNA-Expression wurde in humanen aortalen Endothelzellen in Primärkultur untersucht (siehe Abb. 3.1). Zunächst galt es nachzuweisen, dass der MR endogen in den HAoECs exprimiert wird. Dafür wurde aus Zellen unter unstimulierten Bedingungen RNA isoliert und diese durch die Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, um diese dann für die PCR einzusetzen. Das Produkt der RT-PCR wurde dann aufgetragen. Dabei wurden für die PCR Intron-überspannende Primer verwendet, sowie ein DNase-Verdau durchgeführt, um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen. Die PCR-Fragmente wurden dann auf einem Agarose-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Somit konnte das MR-Fragment bei einer erwartenden Basenpaarlänge von 244 bp nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2).

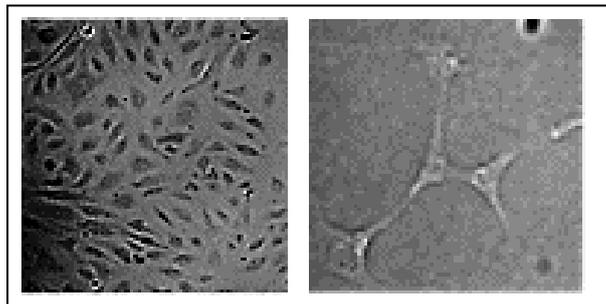


Abbildung 3.1: Humane aortale Endothelzellen (HAoECs) in Primärkultur

3.1.1. MR-Nachweis über RT-PCR

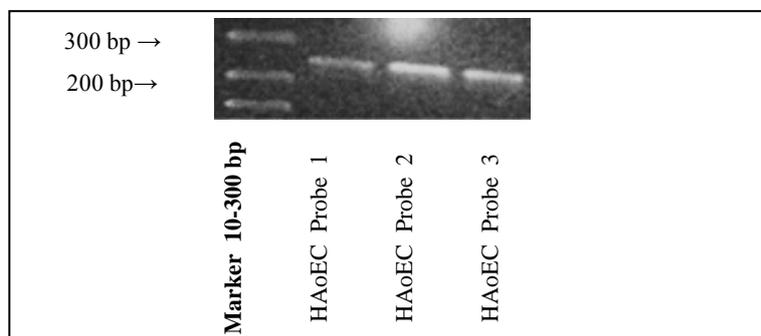


Abbildung 3.2: Der MR ist auf RNA-Ebene in den HAoECs nachweisbar.

3.1.2. MR-Nachweis über Western Blot

Um den MR auch auf dem Proteinebene nachzuweisen, wurden Western Blot Untersuchungen vorgenommen. Mehrere Zelllysate wurden zur Identifizierung des MR gelelektrophoretisch

aufgetrennt, auf einer Membran immobilisiert und durch einen MR-spezifischen Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle wurden unterschiedliche mit hMR transfizierte Zellen eingesetzt: HEK-EGFP-MR und HEK-His-MR. In den HEK-EGFP-MR-Zellen wurde der hMR als ein grün-fluoreszierendes Fusionsprotein (EGFP = Enhanced green fluorescent Protein) in den Zellen exprimiert. Durch das zusätzliche EGFP Protein ist das EGFP-MR-Fusionsprotein schwerer als His-MR, wodurch die Bande bei 132 kDa liegt. Für den MR-Nachweis in den HAoECs wurden unterschiedliche Passagen verwendet. Es konnte mittels Western Blot bei der erwartenden Bande von 102 kDa der MR in allen Zellpassagen detektiert werden (siehe Abb. 3.3).

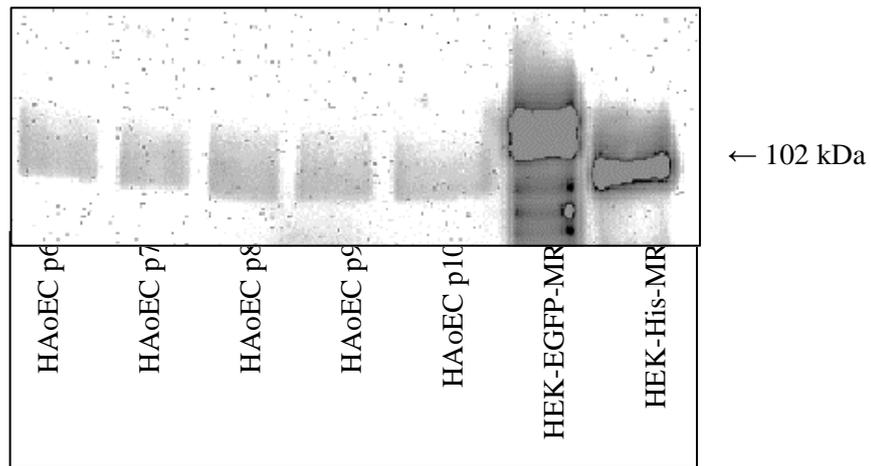


Abbildung 3.3: Im Western Blot ist der MR auf Proteinniveau in unterschiedlichen Zellpassagen (p6-p10) nachweisbar (HEK-EGFP-MR und HEK-His-MR als Positivkontrolle).

3.2. GR-Nachweis in HAoEC

Für die fortführenden Experimente sollte auch der Glukokortikoidrezeptor in den HAoECs nachgewiesen werden. Hierfür wurden Untersuchungen auf RNA-Ebene mittels RT-PCR an unstimulierten Zellen vorgenommen, sowie der Nachweis auf Proteinebene über Western Blot durchgeführt.

3.2.1. GR-Nachweis über RT-PCR

Beim GR-Nachweis auf RNA-Ebene wurde simultan wie beim MR-Nachweis vorgegangen. RNA von unstimulierten HAoECs wurde für die cDNA-Synthese verwendet. Diese wurde mittels RT-PCR amplifiziert und das PCR-Produkt gelelektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Es zeigte sich bei einer erwartenden Basenpaarlänge von 371 bp eine Bande (siehe Abb. 3.4).

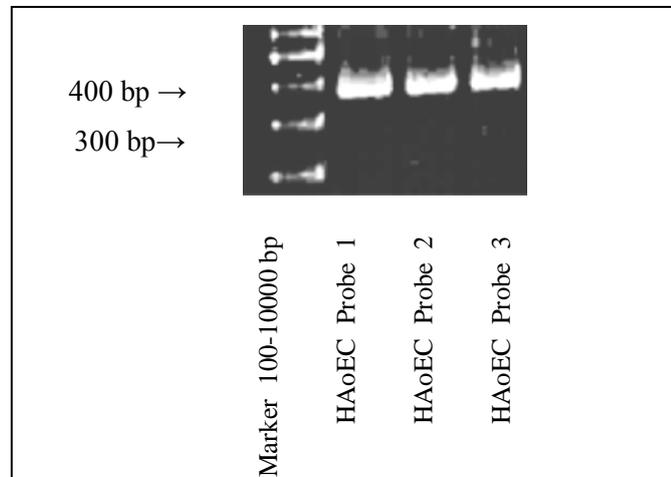


Abbildung 3.4: Der GR ist auf RNA-Ebene in den HAoECs nachweisbar.

3.2.2. GR-Nachweis über Western Blot

Zur Identifizierung des GR auf Proteinebene wurden ebenfalls Western Blot Untersuchungen durchgeführt. Als GR-spezifischer Antikörper wurde der Anti-GR-Antikörper von Santa Cruz Biotechnology angewendet. Für die Kontrollen wurden Zelllysate der HEK-293-Zelllinie verwendet. Einerseits wurden native HEK-Zellen, die den GR endogen exprimieren, andererseits transfizierte HEK-Zellen benutzt: HEK-His-GR. Für den GR-Nachweis in den HAoECs wurden mehrere Zellpassagen untersucht, in denen ausnahmslos der GR bei der erwartenden Bande von 95 kDa detektierbar war (siehe Abb. 3.5).

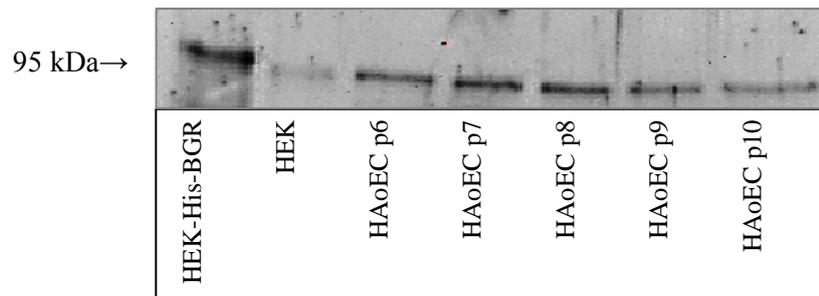


Abbildung 3.5: Im Western Blot ist der GR auf Proteinniveau in unterschiedlichen Zellpassagen (p6-p10) nachweisbar (HEK-HisBGR und native HEK-Zellen als Positivkontrolle).

3.3. Vermehrte Expression des MR unter Inkubation mit Aldosteron

3.3.1. MR-Expression in der RT-PCR

Bei der Quantifizierung des MR auf RNA-Ebene in den HAoECs untersuchten wir neben der Kontrollprobe (DMSO) auch Proben, die zuvor mit 10 nM Aldosteron bzw. 100 nM Dexamethason stimuliert wurden. Dabei zeigte sich unter 24h Inkubation mit 10 nM Aldosteron eine vermehrte Expression des MR ($n=12$; $*p < 0,05$). Eine veränderte Expression des MR durch 24h Inkubation mit 100 nM Dexamethason ($n=5$; $*p < 0,05$) konnte auf mRNA-Expressionsniveau nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.6).

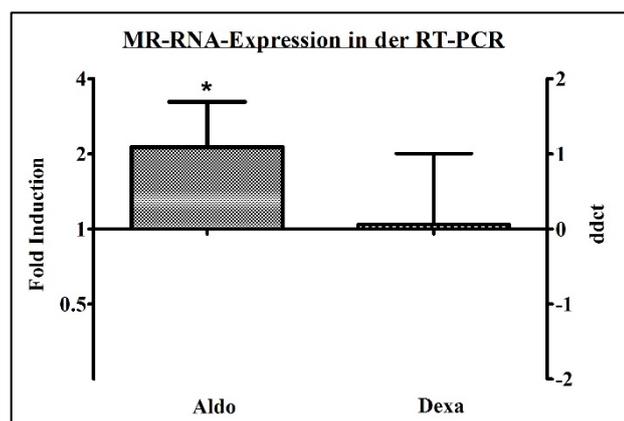


Abbildung 3.6:

Nach einer 24h Inkubation der HAoECs mit 10 nM Aldosteron zeigt sich eine vermehrte Expression des MR auf mRNA-Expressionsniveau ($n=12$; $*p < 0,05$; \pm SEM).

Nach einer 24h Inkubation der HAoECs mit 100 nM Dexamethason zeigt sich keine veränderte Expression des MR auf mRNA-Expressionsniveau ($n=5$; $*p < 0,05$; \pm SEM).

3.3.2. Expression des MR unter Stimulierung mit Canrenoat/Aldosteron in der RT-PCR

Um zu untersuchen, ob die Aldosteron-induzierte MR-Expression MR-abhängig ist, im Sinne einer positiven Feedbackschleife, inkubierten wir die Zellen zum einen für 24h mit 10 μ M Canrenoat. Des Weiteren wurden die HAoECs mit 10 μ M Canrenoat plus 10 nM Aldosteron stimuliert. Canrenoat ist ein kompetitiver MR-Antagonist und der aktive Metabolit des Spironolactons. Durch Hemmung des MR wird die Expression von MR-Ziel-Genen inhibiert. In den PCR-Untersuchungen zeigte sich, dass Canrenoat allein keinen Effekt auf die MR-Expression hat. Bei den Zellen die zuvor mit Canrenoat und Aldosteron inkubiert wurden, zeigte sich auf mRNA-Expressionsniveau kein vermehrter Nachweis des MR in den PCR-Untersuchungen im Vergleich zu den Vehikel-Kontrollen (siehe Abb. 3.7).

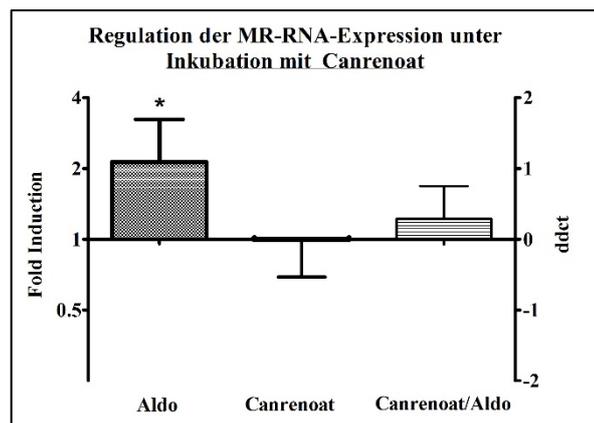


Abbildung 3.7:

Die 24h Inkubation der HAoECs mit 10 nM Aldosteron induziert eine vermehrte Expression der MR-mRNA (n=12; *p < 0,05; \pm SEM).

Canrenoat hat keinen Effekt auf die MR-mRNA-Expression (n=9; *p<0,05; \pm SEM).

Die 24h Inkubation der HAoECs mit 10 μ M Canrenoat/10 nM Aldosteron induziert keine veränderte MR-Expression (n=8; *p < 0,05; \pm SEM).

3.4. GR-Expression bei Inkubation mit Aldosteron

3.4.1. GR-Expression in der RT-PCR

Auf Grund der dargestellten Ergebnisse des MR in der RT-PCR in Abb. 3.7, untersuchten wir ebenfalls die Regulation des GR auf RNA-Ebene. Dafür stimulierten wir die Proben mit 10 nM Aldosteron bzw. 100 nM Dexamethason. Als Kontrolle wurde wieder eine Probe mit DMSO unter gleichen Bedingungen inkubiert. Dabei zeigte sich unter 24h Inkubation mit 10 nM Aldosteron eine vermehrte Expression des GR (n=8; *p<0,05). Eine veränderte Expression der GR-mRNA durch 24h Inkubation mit 100 nM Dexamethason (n=8; *p < 0,05) war nicht nachweisbar (siehe Abb. 3.8).

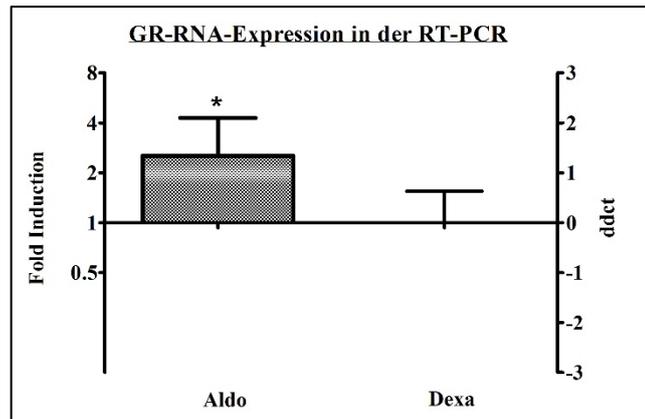


Abbildung 3.8:

Die 24h Inkubation der HAoECs mit 10 nM Aldosteron induziert eine vermehrte Expression des GR auf mRNA-Niveau (n=8; *p < 0,05; ± SEM).

Die 24h Inkubation der HAoECs mit 100 nM Dexamethason induziert keine veränderte Expression des GR auf mRNA-Niveau (n=8; *p < 0,05; ± SEM).

3.5. Analyse der MicroRNA-MicroArray-Daten

Für die MicroRNA-MicroArray-Analysen wurde RNA aus HAoEC-Zellen isoliert, die entweder für 24h mit 10 nM Aldosteron oder 100 nM Dexamethason stimuliert wurden. Im Körper sind 0,1-1 nM Aldosteron physiologisch. Um pathophysiologische Bedingungen zu imitieren, führten wir die Experimente mit 10 nM Aldosteron durch. Die Untersuchung der 3 RNA-Proben wurde von der Firma Miltenyi Biotec kommerziell durchgeführt.

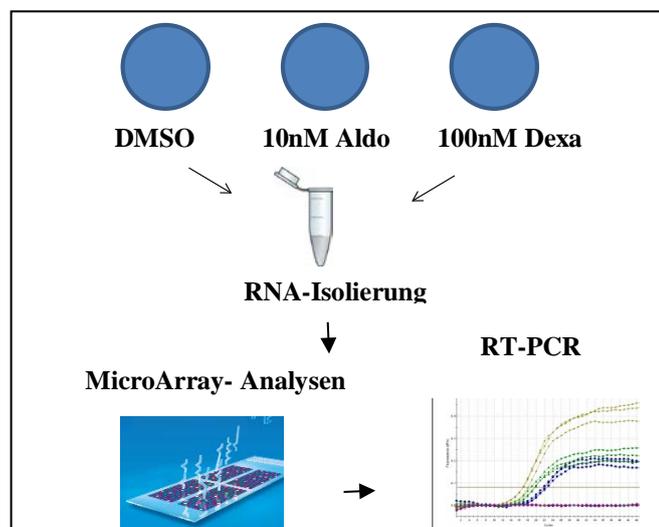


Abbildung 3.9: Experimentdesign für die MicroRNA-MicroArray-Analysen

Für die MicroArray-Analysen kamen Zellen der Passage 5 und Passage 9 zum Einsatz. Anhand der Micro-MicroArray-Untersuchungen konnte ein erstes Screening auf mögliche durch MR- bzw. GR-regulierte MicroRNAs durchgeführt werden. Insgesamt wurde im ersten MicroArray auf 992 und im zweiten MicroArray auf 1006 MicroRNA-Sequenzen untersucht. 11 unterschiedliche MicroRNAs waren in einem der beiden MicroArrays MR/GR- reguliert. Die Abbildung 3.10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der zwei durchgeführten MicroArrays. Eine Validierung erfolgte anschließend mittels RT-PCR.

3.5.1. Darstellung einer allgemeinen Gesamtanalyse der MicroRNA-MicroArray-Daten

Miltenyi Biotec analysiert mit ihrem MicroArray-System ca. 1000 unterschiedliche humane MicroRNA-Sequenzen. Einen Überblick gibt die Abbildung 3.10.

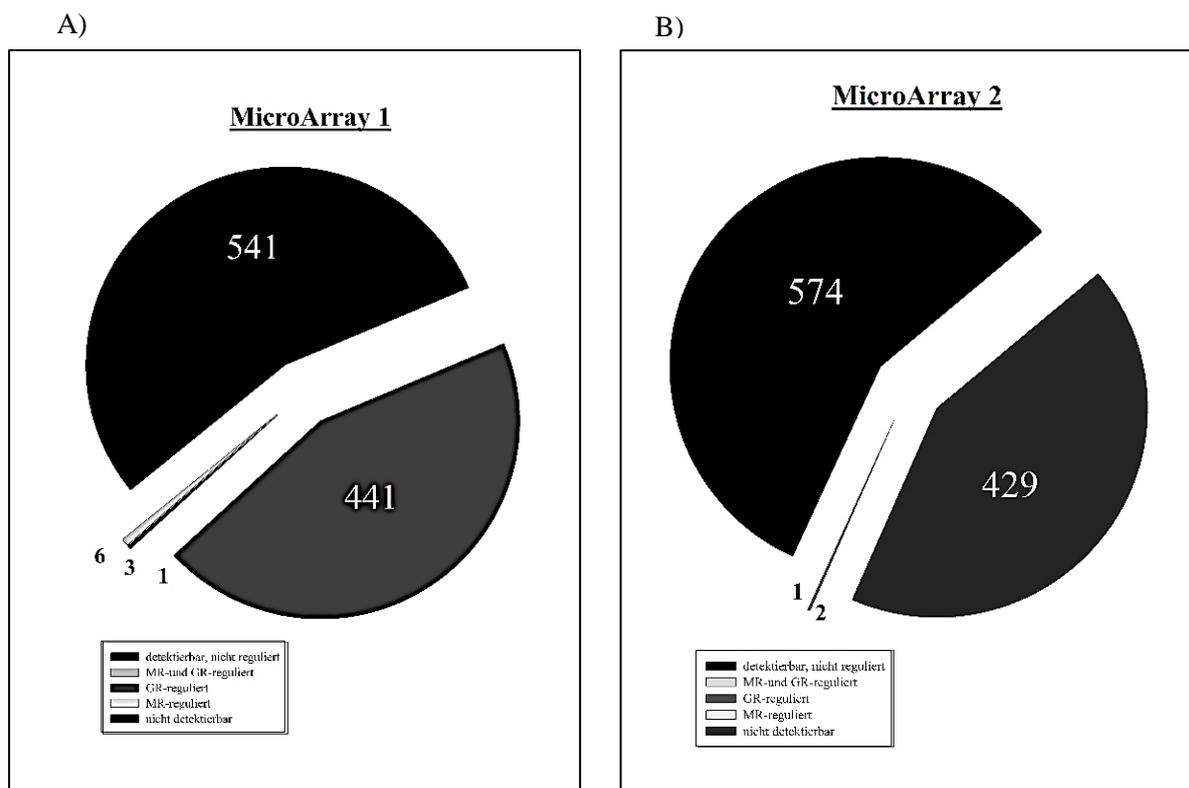


Abbildung 3.10:

- A) MicroArray 1: Insgesamt wurde im MicroArray 1 die Expression von 992 MicroRNA-Sequenzen untersucht. 541 MicroRNA-Sequenzen wurden nachweisbar, aber waren nicht reguliert. 441 MicroRNA-Sequenzen waren nicht nachweisbar. Es wurden 6 MicroRNAs durch MR und GR reguliert, 3 MicroRNAs durch den GR reguliert und 1 MicroRNA durch den MR reguliert.
- B) MicroArray 2: Insgesamt wurde im MicroArray 2 die Expression von 1006 MicroRNA-Sequenzen untersucht. 574 MicroRNA-Sequenzen wurden nachweisbar, aber waren

nicht reguliert. 429 MicroRNA-Sequenzen waren nicht nachweisbar. 1 MicroRNA wurde durch den MR und GR reguliert und 2 MicroRNAs waren GR-reguliert. Durch den MR wurde keine der MicroRNAs reguliert.

3.5.2. Darstellung eines basal exprimierten MicroRNA-Expressionsprofil in den HAoECs

Anhand der absoluten Quantifizierung nachweisbarer MicroRNAs erschloss sich ein basales MicroRNA-Expressionsprofil für die humanen aortalen Endothelzellen. Die absolute Quantifizierung der MicroRNAs beruht auf der parallelen Hybridisierung der Array-Sonde mit der Hy5-markierten RNA-Probe von unstimulierten Zellen und der Hy3-markierten Universalen Referenz, die mit Cy3 ebenfalls bei bekannter Konzentration markiert wurden (Bissels et al., 2009). Dieses Messverfahren der Firma Miltenyi Biotec wurde zum Zeitpunkt der Bestimmung nicht für alle MicroRNAs durchgeführt. Eine absolute Quantifizierung wurde nur für einen Teil der MicroRNAs aufgezeigt. Die genauen Kriterien und Messmethoden wurden nicht veröffentlicht, sodass nicht bekannt ist, wie viele MicroRNAs bezüglich der absoluten Quantifizierung getestet wurden. Aus den uns übermittelten MicroArray-Daten erstellten wir ein endotheliales MicroRNA-Expressionsprofil aus 13 MicroRNAs. Dabei wurden zur Erstellung des Expressionsprofil nur diejenigen MicroRNA-Vertreter eingeschlossen, die in beiden MicroArrays mittels der absoluten Quantifizierung konstant detektierbar waren. Vergleicht man die Daten aus der Tabelle 1.2 (Heusschen et al., 2010) im Vergleich zur Tabelle 3.1, so ist ersichtlich, dass bis auf die MicroRNAs: HSA-MIR-720, HSA-MIR-663, HSA-MIR-638 alle von uns nachgewiesenen MicroRNAs auch im endothelialen MicroRNA-Expressionsprofil von Heusschen et al. vertreten sind.

Tabelle 3.1. Das Basale MicroRNA-Expressionsprofil der HAoECs bestehend aus 13 Vertretern.

MicroRNA	fmol microRNA/ µg RNA	Sequenz	Genomische Lokalisation
HSA-MIR-720	4,84	UCUCGCUGGGGCCUCCA	3:164057129-164061238
HSA-MIR-126-3p	1,57	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	9:139563054-139567138
HSA-MIR-222	1,50	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	X:45604421-45608530
HSA-MIR-663	0,70	AGGCGGGGCGCCGCGGGACCGC	20:26186822-26190914
HSA-MIR-27a	0,61	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	19:13945254-13949331
HSA-MIR-23a	0,47	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	19:13945401-13949473
HSA-MIR-221	0,45	AGCUACAUGUCUGCUGGGUUUC	X:45603585-45607694
HSA-MIR-22	0,27	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	17:1615197-1619281
HSA-MIR-125b	0,26	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	11:121968465-121972552
HSA-MIR-24	0,23	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	9:97846303-97850370
HSA-LET-7a	0,22	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	22:46506629-46510702
HSA-MIR-638	0,14	AGGGAUCGCGGGCGGGUGGCGGCCU	19:10827080-10831179
HSA-MIR-31	0,08	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	9:21510114-21514184

3.5.3. Darstellung nachweisbarer MicroRNAs unter Stimulation mit Aldo oder Dexa

Durch die Analyse der Rohdaten der durchgeführten MicroArrays fiel uns auf, dass bestimmte MicroRNAs (siehe Tabelle 7.1 im Anhang) unter Kontrollbedingungen nicht detektierbar waren, aber unter Inkubation mit 10 nM Aldosteron bzw. 100 nM Dexamethason nachweisbar wurden. Durch Ergebnisse aus der Literaturrecherche entschieden wir, die MIR-1, MIR-153 und MIR-367 weiter zu untersuchen. Um die Beobachtung, dass die Expression bestimmter MicroRNAs durch Aldosteron bzw. Dexamethason induziert werden kann, zu untersuchen, wurden RT-PCR-Untersuchungen mit dem spezifischen TaqMan-System durchgeführt. Diese Experimente wurden mehrmals mit verschiedenen RNA-Proben (MIR-1: n=10; MIR-153: n=7, MIR-367: n=7) unterschiedlicher Passagen (p5-p9) für die 3 MicroRNAs durchgeführt. Jedoch war eine MR- bzw. GR-Regulation, die zu einer induzierten Expression dieser MicroRNAs geführt haben kann, nicht nachweisbar. Die MIR-153 und MIR-367 lagen immer unterhalb der Nachweisgrenze. Für die MIR-1 war einmalig eine MR-Regulation auf niedrigem Niveau nachweisbar. Der Effekt der induzierten MicroRNA-Expression war für diese 3 MicroRNAs aber nicht signifikant reproduzierbar (siehe Abb. 3.11).

	Ct-Werte (MIR)	Ct-Werte (U6)			
DMSO MIR-1	Undetermined	12,31			
DMSO MIR-1	Undetermined	12,37			
DMSO MIR-1	Undetermined	12,46			
Aldo MIR-1	31,14	13,43			
Aldo MIR-1	31,21	13,15			
Aldo MIR-1	31,16	13,26			
Dexa MIR-1	Undetermined	13,53			
Dexa MIR-1	Undetermined	13,56			
Dexa MIR-1	Undetermined	13,29			
	Ct-Werte (MIR)	Ct-Werte (U6)		Ct-Werte (MIR)	Ct-Werte (U6)
DMSO MIR-153	Undetermined	18,67	DMSO MIR-367	Undetermined	18,67
DMSO MIR-153	Undetermined	19,25	DMSO MIR-367	Undetermined	19,25
DMSO MIR-153	Undetermined	19,15	DMSO MIR-367	Undetermined	19,15
Aldo MIR-153	35,49	17,29	Aldo MIR-367	34,70	17,29
Aldo MIR-153	Undetermined	17,95	Aldo MIR-367	Undetermined	17,95
Aldo MIR-153	Undetermined	17,90	Aldo MIR-367	Undetermined	17,90
Dexa MIR-153	36,72	18,80	Dexa MIR-367	35,65	18,80
Dexa MIR-153	Undetermined	18,48	Dexa MIR-367	Undetermined	18,48
Dexa MIR-153	Undetermined	18,81	Dexa MIR-367	Undetermined	18,81

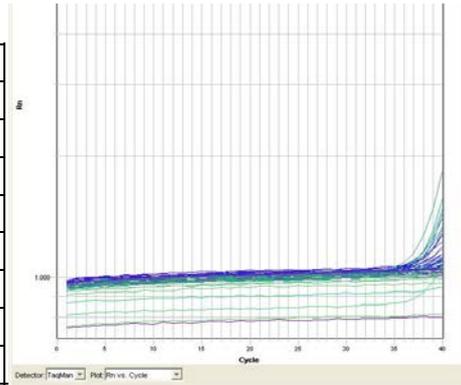


Abbildung 3.11: Auszug aus den Ergebnissen der RT-PCR-Untersuchungen für die MIR-1; MIR-153; MIR-367

3.5.4. Validierung der regulierten MicroRNAs

Eine veränderte MicroRNA-Genexpression wurde anhand der ReRatio-Werte zwischen RNA von Aldo/Dexa-stimulierten Zellen und DMSO-Kontrollen bestimmt. Aus insgesamt ca. 1000 analysierbarer, humaner MicroRNA-Sequenzen zeigte sich für 11 MicroRNAs (siehe Tabelle 3.2) eine mögliche Regulierung durch den MR bzw. GR. Weitere Untersuchungen führten wir bei folgenden MicroRNAs durch: MIR-21, MIR-1908, MIR-2278, MIR-449c-3p sowie MIR-23b, da diese die stärksten Veränderungen in beiden MicroArrays zeigten. Die MIR-1274A und MIR-1274B wiesen ebenfalls eine deutliche Veränderung der Expression auf. Es wurde aber gezeigt, dass diese MicroRNAs Produkte einer tRNA-Lyse sind, daher wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet. Ebenfalls wurde keine weitere Validierung der MicroRNAs LET-7D sowie MIR-345-5p vorgenommen, da diese nur in einem der beiden durchgeführten MicroArrays nachweisbar waren. Auf eine weitere Untersuchung der MIR-484 wurde auf Grund der geringen

Expressionsveränderungen in beiden MicroArrays verzichtet. Für die 5 o.g. MicroRNAs stellte sich tendenziell sowohl unter Inkubation mit Aldosteron, als auch mit Dexamethason eine vermehrte Expression dar. Mit den MicroArray-Untersuchungen war es zwar möglich, simultan hunderte von MicroRNA-Sequenzen zu analysieren, für eine genauere Quantifizierung sollten nun aber diese 5 Vertreter mittels RT-PCR weiter untersucht werden. Zusätzlich untersuchten wir die MIR-29b. Bei dieser MicroRNA zeigte sich in hier nicht dargestellten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine MR/GR-Regulation in vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen, sodass wir entschieden diesen Effekt ebenfalls bei den Endothelzellen zu eruieren.

Tabelle 3.2: Durch MR/GR-regulierte MicroRNAs. (ReRatio > 2: erhöhte Expression; ReRatio < 0,5 verminderte Expression)

MicroRNA	MicroArray 1		MicroArray 2	
	ReRatio (Aldo)	ReRatio (Dexa)	ReRatio (Aldo)	ReRatio (Dexa)
MIR-1274B	1,57	2,19	3,21	3,01
MIR-1274A	1,49	1,86	3,00	3,08
MIR-21	0,66	1,26	2,91	3,30
MIR-1908	1,67	1,46	2,37	3,25
MIR-2278	2,84	2,68	2,10	2,68
MIR-23B	0,78	1,14	2,02	3,63
MIR-449C-3p	1,95	1,95	1,58	2,53
MIR-1469	1,55	1,46	1,42	2,06
LET-7D	-	-	1,39	2,16
MIR-345-5P	-	-	0,41	0,38
MIR-484	1,19	2,18	1,06	1,35

Die Ergebnisse des MicroRNA-MicroArrays sollten nun durch RT-PCR validiert werden. Anfangs führten wir unsere Untersuchungen mit dem MiScript-System durch. Da sich hier eine große Streuung der Ergebnisse zeigte, entschieden wir uns im Verlauf auf das spezifischere TaqMan-System umzusteigen.

(a) HSA-MIR-21

In einem durchgeführten MicroArray zeigte sich unter Inkubation mit 10 nM Aldosteron eine 2,9-fach vermehrte Expression und unter Stimulierung mit 100 nM Dexamethason eine 3,3-fach erhöhte Expression. Um diesen Effekt zu validieren, führten wir RT-PCR-Untersuchungen sowohl mit dem MiScript-System als auch mit dem spezifischeren TaqMan-System durch. In den Experimenten mit beiden Systemen konnten wir weder in den Aldosteron-inkubierten, noch in den Dexamethason-inkubierten Proben eine vermehrte Expression der MIR-21 nachweisen (siehe Abb. 3.12).

A)

B)

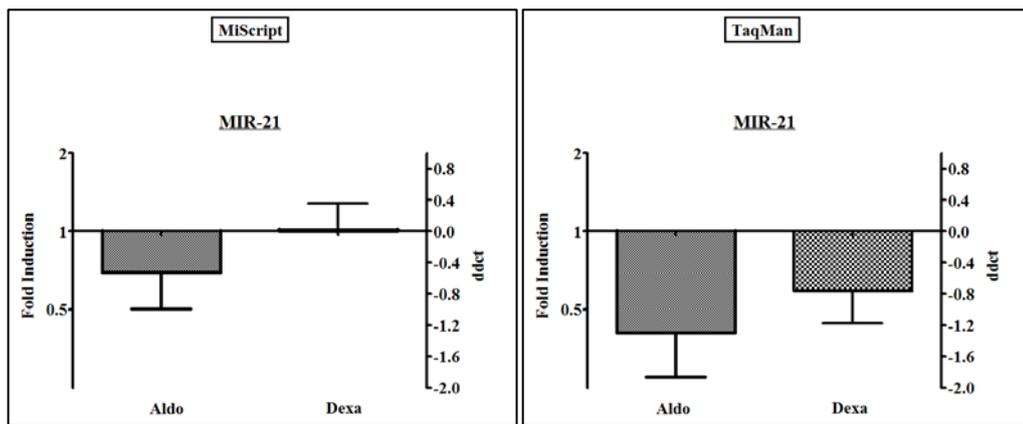


Abbildung 3.12:

- A) **MiScript:** Es zeigte sich keine MR- oder GR-abhängige Expression der MIR-21 (MR: n=9; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=9; *p < 0,05; ± SEM).
- B) **TaqMan:** Es zeigte sich keine MR- oder GR-abhängige Expression der MIR-21 (MR: n=5; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=5; *p < 0,05; ± SEM).

(b) HSA-MIR-23b

In der einen MicroArray-Untersuchung zeigte sich für die MIR-23b eine vermehrte MR/GR-regulierte Expression. Die Inkubation mit 10 nM Aldosteron führte zu einer 2-fach erhöhten Expression. Bei den mit 100 nM Dexamethason stimulierten Proben war eine 3,6-fach erhöhte Expression ersichtlich. Wir versuchten dieses Ergebnis mit der RT-PCR zu validieren und verwendeten das MiScript-System. Bei den Untersuchungen konnte ein MR- bzw. GR-Regulation nicht reproduziert werden, sodass keine weiteren Experimente vorgenommen wurden (siehe Abb. 3.13).

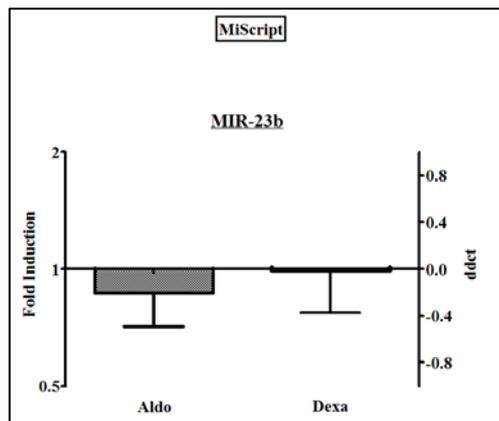


Abbildung 3.13: Die MR/GR-induzierte vermehrte Expression der MIR-23b im MicroArray konnte in den RT-PCR-Untersuchung mit dem MiScript nicht nachgewiesen werden (n=5; *p < 0,05; ± SEM).

(c) HSA-MIR-449c-3p

In beiden durchgeführten MicroArrays zeigte sich unter Inkubation mit 10 nM Aldosteron tendenziell eine vermehrte Expression der MIR-449c-3p (MicroArray1: ReRatio = 1,95; MicroArray2: ReRatio = 1,58). Um eine etwaige Regulierung nachzuweisen, führten wir RT-PCR-Untersuchungen mit dem MiScript-System durch. Hierbei konnte kein regulierender Effekt auf die Expression der MIR-449c-3p verifiziert werden. Zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse verwendeten wir das spezifischere TaqMan-System. Eine veränderte Expression der MIR-449c-3p durch den MR konnte nicht nachgewiesen werden.

Für den GR zeigte sich in dem einen MicroArray nach Inkubation mit 100 nM Dexamethason eine 2,5-fach gesteigerte Expression im Vergleich zu DMSO-Kontrolle. In dem zweiten durchgeführten MicroArray zeigte sich ein ReRatio-Wert von 1,95. Zur Validierung wurden auch hier zunächst RT-PCR-Untersuchungen mit dem MiScript-System vorgenommen. Dabei war keine GR-abhängige Regulation der Genexpression nachweisbar. In den Experimenten mit dem TaqMan-System konnte ebenfalls keine GR-abhängige Regulation der MIR-449c-3p verifiziert werden (siehe Abb. 3.14).

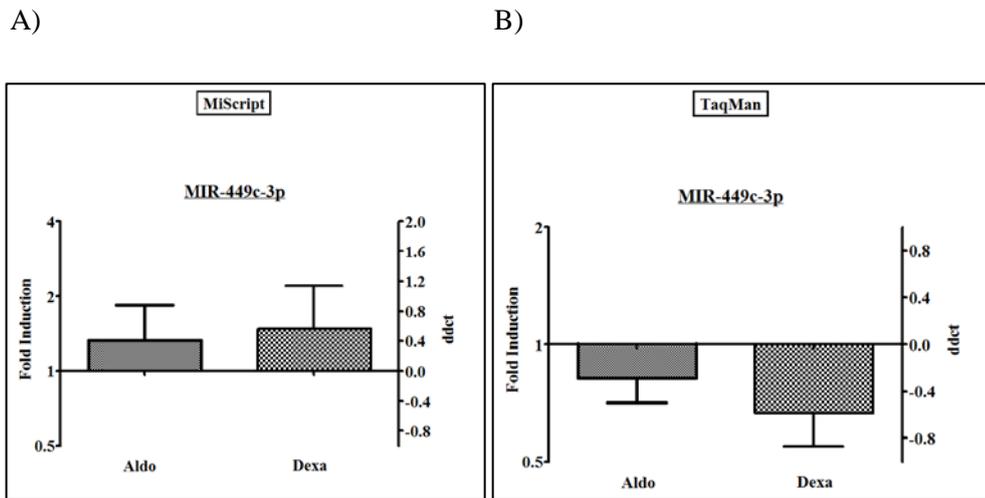


Abbildung 3.14:

- A) **MiScript:** Es zeigte sich keine MR- oder GR-abhängige Expression der MIR-449c-3p (MR: n=5; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=5; *p < 0,05; ± SEM).
- B) **TaqMan:** Es zeigte sich keine MR- oder GR-abhängige Expression der MIR-449c-3p (MR: n=21; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=20; *p < 0,05; ± SEM).

(d) HSA-MIR-1908

In einer MicroArray-Untersuchung zeigte sich für die MIR-1908 eine vermehrte MR/GR regulierte Expression. Die Inkubation mit 10 nM Aldosteron führte zu einer 2,4-fach vermehrten Expression. Bei den mit 100 nM Dexamethason stimulierten Proben war eine 3,3-fach erhöhte Expression ersichtlich. Wir versuchten dieses Ergebnis mit der RT-PCR zu validieren und verwendeten auch hier zunächst das MiScript-System. Bei den Untersuchungen konnte ein MR- bzw. GR- Regulation nicht reproduziert werden. Bei den Experimenten mit dem TaqMan-System zeigte sich ein ähnliches Bild. Eine vermehrte Expression des MR war nicht ersichtlich. Für den GR konnten geringe Effekte gezeigt werden, eine veränderte Expression der MIR-1908 konnte nicht verifiziert werden (siehe Abb. 3.15).

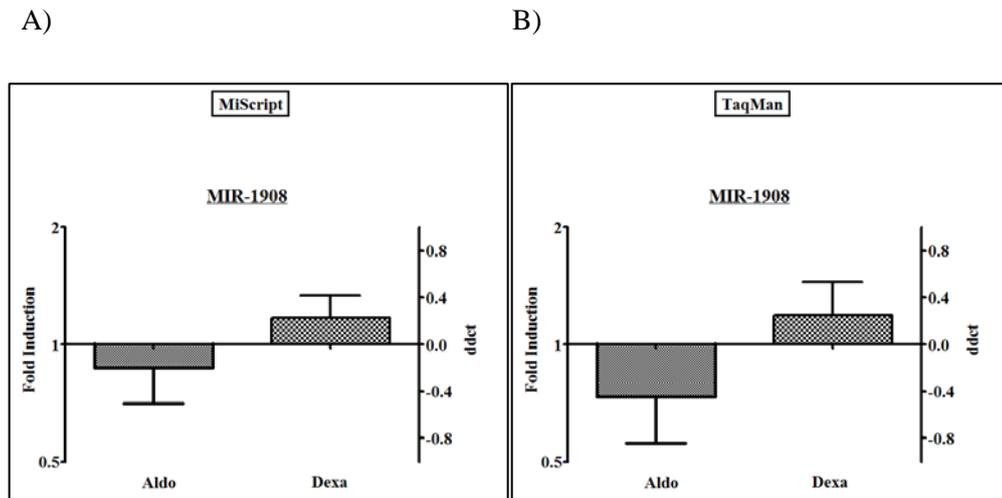


Abbildung 3.15:

- A) **MiScript:** Die MR/GR-induzierte erhöhte Expression der MIR-1908 im MicroArray konnte durch Validierung mittels RT-PCR mit dem MiScript-System nicht reproduziert werden (MR: n=4; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=5; *p < 0,05; ± SEM).
- B) **TaqMan:** Es zeigte sich in den in den TaqMan-Untersuchungen keine veränderte Expression (MR: n=10; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=10; *p < 0,05; ± SEM).

(e) HSA-MIR-2278

In beiden MicroArray-Untersuchungen zeigte sich in den HAoECs eine vermehrte Expression der MIR-2278 sowohl unter Inkubation mit 10 nM Aldosteron, als auch unter Stimulierung mit 100 nM Dexamethason. Diese MR-Regulation war jedoch in den PCR-Experimenten mit dem MiScript-System nicht mehr reproduzierbar. Wir untersuchten die RNA mit dem spezifischeren TaqMan-System erneut und konnten dann eine signifikante MR-abhängige vermehrte Expression der MIR-2278 nachweisen. Unter Inkubation mit 100 nM Dexamethason zeigte sich in den MicroArray-Untersuchungen für die MIR-2278 eine 2,2-fach erhöhte Expression. Wir konnten hingegen in den RT-PCR-Experimenten mit dem MiScript-System sowie mit dem TaqMan-System keine GR-abhängige Regulation für die MIR-2278 nachweisen (siehe Abb. 3.16).

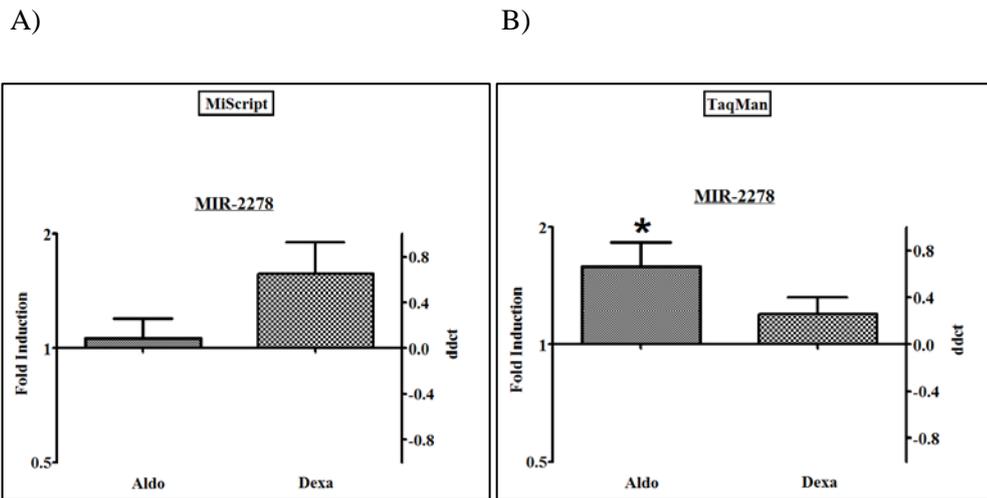


Abbildung 3.16:

- A) **MiScript:** Es zeigte sich keine MR- oder GR-abhängige Expression der MIR-2278 (MR: n=5; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=5; *p < 0,05; ± SEM)
- B) **TaqMan:** Die vermehrte Expression der MIR-2278 im MicroArray durch Stimulation mit Aldo war in den RT-PCR-Untersuchungen mit dem TaqMan-System signifikant (*) nachweisbar (n= 16; *p < 0,05; ± SEM). Eine GR-induzierte vermehrte Expression der MIR-2278 war hingegen nicht reproduzierbar (n=13; * p < 0,05; ± SEM).

(f) HSA-MIR-29b

Die MIR-29b zeigte in den MicroArray-Untersuchungen keine MR/GR-Regulation. Hingegen konnte in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe eine Regulation in humanen glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden, sodass wir, unabhängig von den MicroArray-Ergebnissen, Untersuchungen dazu durchführten. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Regulation auf die glatten Gefäßmuskelzellen beschränkt zu sein scheint. In den RT-PCR-Experimenten konnte mit beiden Systemen keine signifikante Regulation nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.17).

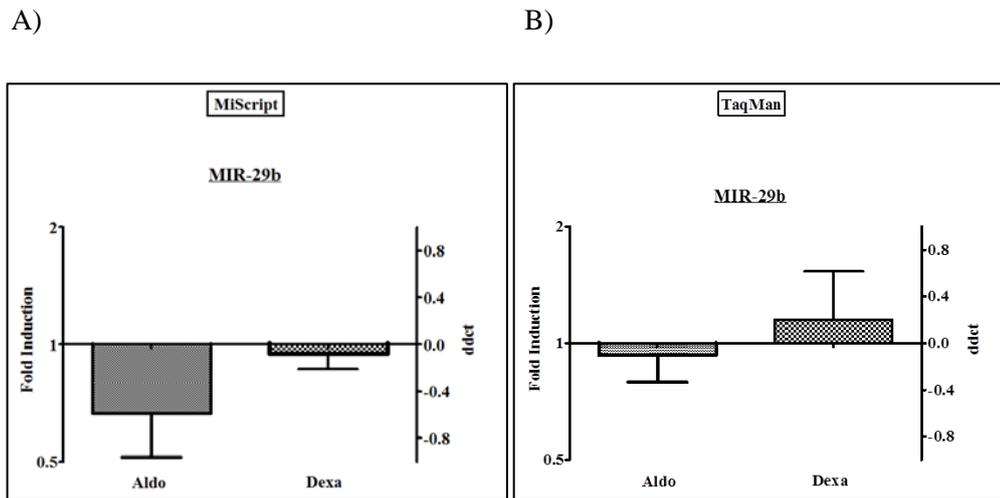


Abbildung 3.17:

- A) **MiScript:** In den RT-PCR-Untersuchungen mit dem MiScript-System zeigte sich keine MR- oder GR-abhängige Expression der MIR-29b (MR: n=3; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=3; *p < 0,05; ± SEM).
- B) **TaqMan:** In den RT-PCR-Untersuchungen mit dem TaqMan-System zeigte sich keine MR- oder GR-abhängige Expression der MIR-29b (MR: n=10; *p < 0,05; ± SEM; GR: n=10; *p < 0,05; ± SEM).

3.5.5. Untersuchung der MIR-2278-Regulation in Reporter-Genanalysen

Um den Einfluss des MR auf die Regulation der MIR-2278-Expression weiter zu validieren, führten wir Luciferase-Reporter-Genanalysen mit einem spezifischen Vektor durch. In diesen Reporter-Vektoren wurde eine Bindungsstelle für die MIR-2278 in die 3'UTR-Region des Firefly-Luciferase-Gens kloniert. Eine verminderte Firefly-Luciferase-Aktivität bedeutet eine vermehrte Expression der MicroRNA-2278. Für diese Untersuchungen wurden EA.hy926-Zellen verwendet. Um den Effekt des MR auf die MIR-2278-Regulation nachzuweisen, wurden in die Zellen der pMIR-2278-Luc Reporter-Vektor, ein hMR-Expressionsplasmid sowie ein Plasmid mit dem konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase-Gen zur Normalisierung der Werte transfiziert. Dann wurden die Zellen mit 10 nM Aldosteron inkubiert oder als Kontrolle mit DMSO für jeweils 24h und 48h. In den Untersuchungen für 24h mit Aldo zeigte sich nur eine geringe Reduktion der Luciferase-Aktivität um ca. 10 %. Nach Inkubation mit Aldosteron für 48h konnte eine Reduktion der Luciferase-Aktivität um ca. 50 % nachgewiesen werden, was eine vermehrte MR-induzierte MicroRNA-2278-Expression aufzeigt. Als Positivkontrolle und um zu untersuchen ob eine Inkubation mit Aldosteron auch bei starker Erhöhung der MIR-2278 zu einem Effekt führt, wurden zusätzlich MicroRNA-Mimics in die EA-hy926-Zellen transfiziert. Es zeigte sich in diesen Experimenten bei Inkubation mit Mimic + DMSO (Kontrolle) für 24h

eine Reduktion der Luciferase-Lumineszenz um ca. 80 %, durch Inkubation mit Aldosteron konnte dieser Effekt noch erhöht werden, sodass eine Reduktion um ca. 90 % ersichtlich war. Bei der Inkubation für 48h mit DMSO bzw. Aldosteron zeigte sich noch ein etwas größerer Effekt auf die Luciferase-Aktivität (siehe Abb. 3.18).

A)

B)

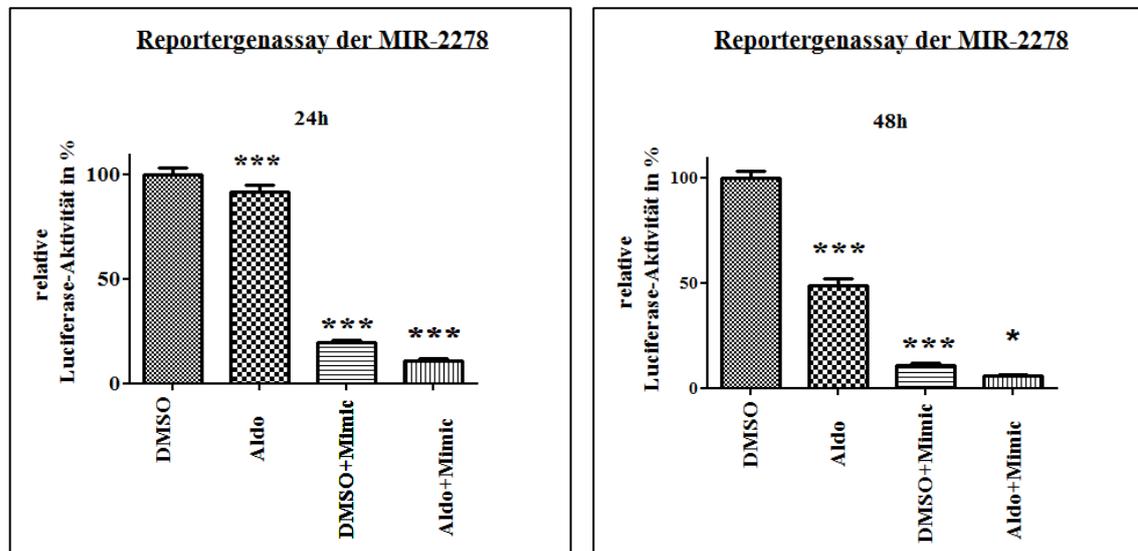


Abbildung 3.18:

- A) **24h:** Nach Inkubation mit 10 nM Aldosteron für 24h zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) in den mit hMR und pMIR-2278-Luc transfizierten EA.hy926-Zellen eine geringe Reduktion der Luciferase-Aktivität ($n=24$; $p < 0,05$; \pm SEM). Die zusätzliche Transfektion der EA.hy926-Zellen mit MIR-2278-Mimics wies unter Kontrollbedingungen eine Reduktion der Luciferase-Aktivität um 80 % auf ($n=24$; $p < 0,05$; \pm SEM). Die Inkubation mit Mimics und 10 nM Aldosteron für 24 zeigte eine weitere Inhibierung der Luciferase-Aktivität um 10 % im Vergleich zur Kontrolle ($n=12$; $p < 0,05$; \pm SEM).
- B) **48h:** Nach Inkubation mit 10 nM Aldosteron für 48h zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle (DMSO) in den mit hMR und pMIR-2278-Luc transfizierten EA.hy926-Zellen eine Reduktion der Luciferase-Aktivität um 50 % ($n=18$; $p < 0,05$; \pm SEM). Die mit MIR-2278-Mimics transfizierten Zellen zeigten nach 48h Inkubation mit DMSO ($n=18$; $p < 0,05$; \pm SEM) sowie Aldosteron ($n=9$; $p < 0,05$; \pm SEM) einen größeren inhibierenden Effekt auf die Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den Experimenten mit einer 24h Inkubation.

3.5.6. Bioinformatische Targetsuche der MIR-2278

Die MIR-2278 ist in ihrer funktionellen Rolle und möglichen zellspezifischen Expression kaum erforscht. Die Recherche nach möglichen Targets in mehreren unterschiedlichen Datenbanken zeigte jedoch interessante Zielstrukturen der MIR-2278 auf. Die Datenbank MIRDB identifizierte den Glukokortikoid-Rezeptor als Target, die MiRanda-Datenbank wiederum den Mineralokortikoid-Rezeptor als Zielstruktur. Daher gehen wir von einer möglichen Interaktion zwischen der MIR-2278 und den Transkriptionsfaktoren MR und GR aus. Ein Überblick über die Zielgene, die von beiden Datenbanken vorhergesagt werden, gibt Tabelle 3.3. Eine besonders hohe Aussagekraft haben Targets mit einem hohen Target-Rank bezogen auf die Datenbank MIRDB. Hingegen weist ein niedriger MIR-SVR-Score in der MiRanda-Datenbank eine hohe Übereinstimmung auf.

Tabelle 3.3: Bioinformatisch vorhergesagte Zielgene der MIR-2278 aus den beiden Datenbanken MiRanda und MIRDB

Proteinname	Gensymbol	Target Rank	MIR-SVR-Score	Funktion	Zellspezifität
1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase	PIKFYVE	18	-2,25	ATP-Stoffwechsel	
Junctophilin-1	JPH1	82	-2,24	Bildung von Membrankomplex, Crosstalk zwischen Zelloberfläche und intrazellulären Kalziumkanälen	
Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	44	-1,82	Proteintransport	
Macrophage colony-stimulating factor 1	CSF1	105	-1,62	Immunität, Inflammatory Response, Makrophagendifferenzierung, Monozytenaktivierung	
Protein MCM10 homolog	MCM10	38	-1,53	DNA-Replikation	
RING1 and YY1-binding protein	RYBP	6	-1,42	Apoptose, Transkriptionsregulation	Lymphozytäre Gewebe, Testis
Sodium/hydrogen exchanger 6	SLC9A6	259	-1,42	Ionentransport, Natriumtransport	Gehirn, Herz, Skelettmuskel
Cysteine-rich motor neuron 1 protein	CRIM1	9	-1,41	ZNS-Entwicklung, Motoneuron-Differenzierung, Angiogenese	Blutgefäße, Herz, Gehirn, Pankreas, Milz, Leber, Placenta, Lunge, Niere, Pankreas, Skelettmuskel
Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	KCNH2	130	-1,32	Kaliumtransport, Ionentransport	Herz, Gehirn
Differentially expressed in FDCP 6 homolog	DEF6	85	-1,32	Aktivierung von RHO GTPasen	Zellen des Immunsystems
Paired box protein Pax-9	PAX9	35	-1,31	Transkriptionsregulation	
Growth factor receptor-bound protein 7	GRB7	36	-1,3	EGFR-Signalweg, Blutgerinnung, Leukozytenmigration	
Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 3	EGLN3	14	-1,28	Antwort auf Hypoxie, Zellproliferation, Apoptose	v. a. Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen, aortalen Endothelzellen,
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	SKP1	102	-1,27	Interaktion mit HSP90, Mitose, Immunantwort	
Beta-sarcoglycan	SGCB	144	-1,21	Muskelentwicklung, Zytoskelettorganisation	v. a. Herz und Skelettmuskel
Complement receptor type 2	CR2	5	-1,2	Immunität, Komplement-Signalweg	Lymphatisches Gewebe
Ephrin-A3	EFNA3	195	-1,15	Ephrin-Rezeptor-Aktivität, Zell-Zell-Interaktion	Gehirn, Skelettmuskel, Milz, Thymus, Prostata, Testis, Ovar, Darm, Leukozyten
T-lymphocyte activation antigen CD80	CD80	201	-1,12	T-Zellaktivierung, IL-2-Biosynthese, G-MSF-Biosynthese, Transkriptionsregulation	B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen
Ephrin type-A receptor 2	EPHA2	370	-1,09	Angiogenese, Apoptose, Zelladhäsion, ERK1/ERK2-Kaskade, Endothelzellmigration	Gehirn, Gliomzelllinien, Haut, Darm, Lunge, Ovar
Probable ergosterol biosynthetic protein 28	C14orf1	123	-1,07	Steroidbiosynthese, Lipidbiosynthese	ubiquitär

4. Diskussion

4.1. Aldosteron-induzierte MR-Expression in HAOECs

Zum Nachweis des MR in den HAOECs führten wir PCR-Untersuchungen durch und konnten dabei den MR auf RNA-Niveau detektieren. Wir verwendeten für diese Experimente sowohl RNA von unstimulierten Zellen als auch von Zellen, die zuvor mit 10 nM Aldosteron bzw. 100 nM Dexamethason inkubiert wurden. Dabei zeigte sich für die mit Aldosteron-inkubierten Zellen eine vermehrte Expression des MR. Die Regulierung der MR-Expression beim Menschen ist aber bislang wenig erforscht. In humanen Leukozyten konnte eine negative Regulation von Aldosteron auf die MR-Expression gezeigt werden (Armanini et al., 1987; Armanini et al., 1992). Man nimmt an, dass die Expression des MR sowohl im klassischen Sinne durch transkriptionelle Kontrolle, aber auch durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert wird (Viengchareun et al., 2007). Fest steht jedoch, dass die MR-Expression durch komplexe, regulatorische Prozesse reguliert wird, die gewebsabhängig unterschiedlich sind. In verschiedensten Studien wurde dargelegt, dass Steroidhormone einen nicht unerheblichen Einfluss auf die MR-Expression haben (siehe Tabelle 4.1). Für den Progesteron-Rezeptor nach Aktivierung durch seinen Liganden Progesteron wurde gezeigt, dass er in der Lage ist, die mRNA-Menge des MR in primären neuronalen Zellen des Hippocampus zu erhöhen (Castren et al., 1995a). Weitere Untersuchungen offenbarten, dass eine Stimulation dieser neuronalen Zellen mit Aldosteron und Dexamethason dosisabhängig ebenfalls eine Erhöhung der MR-mRNA bewirken. Funktionelle Analysen in Neuroblastomzellen ergaben, dass die Glukokortikoide über einen direkten, transkriptionellen Mechanismus den MR-Promotor aktivieren (Castren et al., 1995b). Wir hingegen konnten keine veränderte Expression des MR nach Inkubation mit Dexamethason in den HAOECs detektieren. Weiterhin ist beschrieben, dass der MR und GR ein Heterodimer bilden können. Dieser Mechanismus scheint ebenfalls eine Rolle in der Modulation der Expression der Steroidrezeptoren wie dem MR zu spielen (Liu et al., 1995; Trapp et al., 1994)

Tabelle 4.1: Gewebsabhängige Regulation der MR-mRNA-Expression durch Steroidhormone

Stimulation mit	Gewebe/Zelltyp	Effekt auf MR	Referenz
Aldosteron	humane Leukozyten	Verminderte Expression	(Armanini et al., 1987; Armanini et al., 1992)
Progesteron	neuronalen Zellen des Hippocampus der Ratte	Vermehrte Expression	(Castren et al., 1995a)
Aldosteron, Dexamethason	neuronalen Zellen des Hippocampus der Ratte	Vermehrte Expression	(Castren et al., 1995b)
Aldosteron	embryonale Stammzellen der Maus	Vermehrte Expression	(Munier et al., 2010)

Aldosteron, Dexamethason	Niere, Herz, Kolon der Ratte	kein Effekt	(Escoubet et al., 1996)
-----------------------------	---------------------------------	-------------	-------------------------

In neueren Untersuchungen zur neuronalen Differenzierung konnte in embryonalen Stammzellen der Maus eine Aldosteron-induzierte vermehrte Expression des MR gezeigt werden. Dabei wurden diese Zellen für 24h mit jeweils 100 nM Progesteron, 100 nM Dexamethason und 100 nM Aldosteron inkubiert. Aber nur Aldosteron war in der Lage effektiv die MR-Expression signifikant zu erhöhen. Weitere Untersuchungen zur Promotoraktivität zeigten, dass durch eine MR-Inhibierung über siRNAs die Aldosteron-induzierte erhöhte P2-Aktivität reduziert werden kann (Munier et al., 2010). Dies lässt vermuten, dass die Aldosteron-induzierte vermehrte Expression des MR, MR- und P2-abhängig ist. Daher ist anzunehmen, dass der Effekt auf den MR, den wir in den HAoECs nach Inkubation mit 10 nM Aldosteron sehen, ebenfalls MR-abhängig ist. Diese Aussage wird vor allem gestützt durch Experimente unsererseits, in denen wir unter Inkubation der Zellen mit dem MR-Antagonisten Canrenoat plus 10 nM Aldosteron keine Aldosteron-induzierte vermehrte Expression des MR mehr nachweisen konnten. Des Weiteren muss erwähnt werden, dass wir in unseren Experimenten bereits eine vermehrte Expression bei Konzentrationen von 10 nM Aldosteron induzieren konnten. In den Untersuchungen von Munier et al. (2010) wurde dies erst bei einer Konzentration von 100 nM ersichtlich. Ob diese Regulation durch direkte Bindung an die DNA erfolgt, bleibt offen. Zuvor wurde aber gezeigt, dass der P2 durch den Aldosteron-aktivierten MR eine erhöhte Aktivität aufweist, wobei dies nicht durch eine Bindung an einer definierten Stelle des Promotors bewirkt wird, sondern wahrscheinlich über nicht-klassische Effekte induziert wird (Zennaro et al., 1996). Es ist bekannt, dass der MR auch nicht-genomische Effekte über Beeinflussung verschiedenster Signalwege bewirkt (Gekle and Grossmann, 2009). Zudem enthält der MR verschiedenste Domänen (LBD, AF1, AF2, NTD), mit denen er unterschiedlichste Interaktionen mit vielen Koaktivatoren und Korepressoren eingehen kann ohne eine direkte Interaktion mit der DNA eingehen zu müssen (Viengchareun et al., 2007). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Regulation der MR-Expression durch verschiedenste Mechanismen moduliert werden kann, die abhängig sind von der Zellart, den physiologischen Bedingungen und den beteiligten Faktoren. In HAoECs konnten wir zeigen, dass es durch Aldo MR-abhängig zu einer erhöhten MR-Expression kommt, deren Mechanismus noch unklar ist (siehe Abb. 4.1).

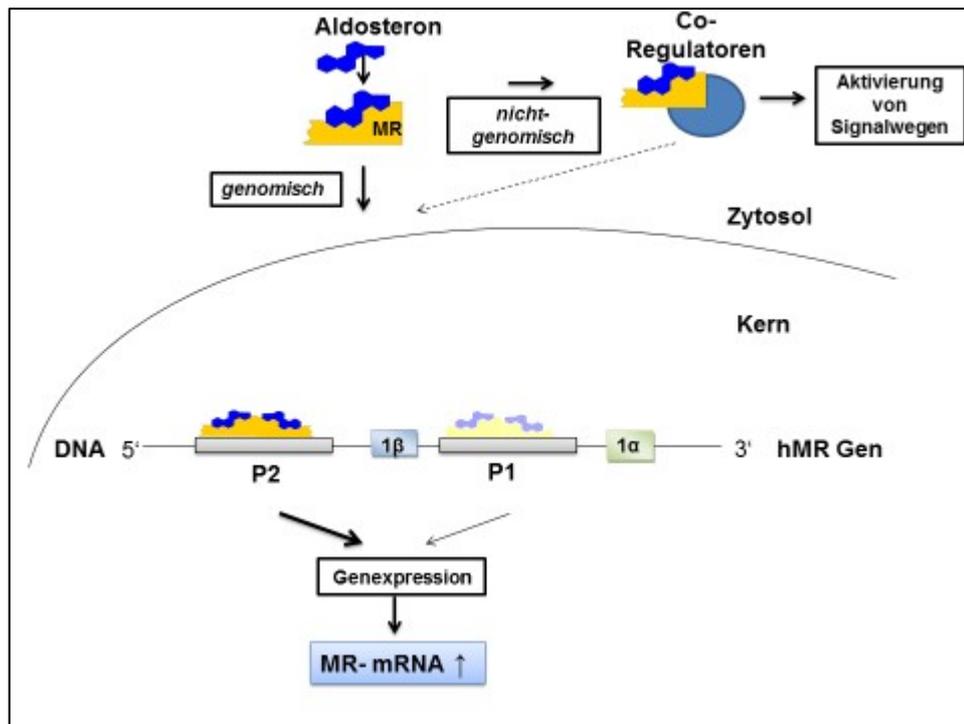


Abbildung 4.1: Modell der Regulation der MR-Expression in HAoECs

- A) *genomisch*: Stimulierung der Zellen mit Aldosteron induziert MR-abhängig über genomische Vorgänge eine vermehrte Promotoraktivität, die zur erhöhten Genexpression des MR führt.
- B) *nicht-genomisch*: Der aktivierte MR führt über nicht-genomische Vorgänge zur Beeinflussung von bestimmten Koregulatoren, die in genomische Prozesse involviert sind oder auf andere Signalwege einwirken, die im Endresultat ein erhöhtes MR-mRNA-Expression induzieren. Dies könnte durch Modulation der MR-mRNA-Stabilität oder der MR-Syntheserate bedingt sein.

4.2. Die Bedeutung des basalen MicroRNA-Expressionsprofils der HAoECs

Anhand der absoluten Quantifizierung erstellten wir ein MicroRNA-Expressionsprofil für die humanen aortalen Endothelzellen, das aus 13 Vertretern besteht. Die Expression von MicroRNAs ist gewebsspezifisch, als auch krankheits- und entwicklungsspezifisch (Divakaran and Mann, 2008). Mehrere Gruppen untersuchten bereits das Expressionsprofil von humanen Endothelzellen, sodass mehr als 200 MIRs beschrieben sind, die in Endothelzellen eine Rolle spielen (Chen et al., 2008; Fasanaro et al., 2008; Kuehbacher et al., 2007; Poliseno et al., 2006; Pulkkinen et al., 2008; Suarez et al., 2007; Suarez et al., 2008; Wurdinger et al., 2008). Die Forschungsgruppe um Heusschen erstellte aus den gesamten Profil-Studien ein endotheliales MicroRNA-Expressionsprofil aus insgesamt 28 MicroRNAs. Hierbei gruppieren sie diejenigen Vertreter zum Profil, die in den insgesamt 8 Profil-Studien fünfmal nachweisbar waren (siehe

Tabelle 1.2). Anhand unseres MicroRNA-Expressionsprofils wird ersichtlich, dass sich einige dieser Vertreter auch in den Expressionsprofilen anderer Forschungsgruppen wiederfinden. Hierzu gehören die MicroRNAs: MIR-23a; MIR-24; MIR-27a; MIR-31; MIR-125b; MIR-126-3p; MIR-221; MIR-222; LET-7a. Im Folgenden ist zusammengetragen, welche funktionelle Rolle für die MicroRNA unseres basalen Expressionsprofils bekannt ist. Es wird deutlich, dass die meisten dieser MicroRNAs eine entscheidende Rolle in physiologischen, als auch krankheitsspezifischen Prozessen des kardiovaskulären Systems zu spielen scheinen.

Die HSA-MIR-126-3p wird Endothel-spezifisch exprimiert und spielt in der Angiogenese, der vaskulären Integrität und der Endothelzellproliferation sowie –Migration eine entscheidende Rolle (Wang et al., 2008). Die höchste Expression zeigte sich für die MIR-720 in unseren Untersuchungen. Die MIR-720 wird in verschiedenen Karzinomen exprimiert, daneben spielt sie eine Rolle in der Aktivität der endothelialen Vorläuferzellen, in dem sie das Vasoinhibin-1 stimuliert (Wang et al., 2014b). Es wurde gezeigt, dass in endothelialen Vorläuferzellen und im Plasma von Patienten mit koronarer Herzerkrankung, die MIR-720 vermindert exprimiert wird und somit involviert ist in die Pathogenese der koronaren Herzerkrankung. Auch für die MIR-31 wurde eine bedeutende Rolle in den pathophysiologischen Vorgängen der koronaren Herzerkrankung verifiziert (Wang et al., 2014a). Die MicroRNAs MIR-221 und MIR-222 bilden zusammen ein Cluster, d.h. sie werden von demselben Promotor reguliert. Sie werden zwar vermehrt in Endothelzellen exprimiert, sind aber nicht spezifisch dafür, u.a. werden sie auch in Tumorzellen exprimiert. Dort hemmen sie die Expression des Zellzyklusprotein Protein p27^{kip1}. Das Protein p27^{kip1} ist ein CDK-Inhibitor-Protein und wirkt hemmend auf den Zellzyklus und ist somit tumorsuppressiv (Heusschen et al., 2010). Des Weiteren haben sie onkogene Eigenschaften, indem sie den Stammzellwachstumsfaktorrezeptor c-Kit (CD117) regulieren (Sen et al., 2009). Die MIR-221/MIR-222 gehören zu den Vertretern, die auf die Angiogenese einen hemmenden Einfluss ausüben (Urbich et al., 2008). Die MicroRNA LET-7a gruppiert man zur LET-7-Familie, die aus insgesamt 13 Vertretern von MicroRNAs der humanen Spezies besteht. Die Gene dafür sind hochkonserviert über alle Spezies hinaus (Wu et al., 2009). Mitglieder der LET-7-Familie werden vermehrt in HUVECs exprimiert (Wu et al., 2009). Die MicroRNAs der LET-Familie beeinflussen die Endothelzellproliferation und –Motilität (Otsuka et al., 2008). Die MicroRNAs MIR-23a, MIR-24 und MIR-27a bilden das 24-2-Cluster, zusätzlich beinhaltet es die MicroRNAs MIR-23b und MIR-27b. Für diese MicroRNAs konnte eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Krankheiten insbesondere kardiovaskulärer Erkrankungen gezeigt werden (Bang et al.). So sind sie beispielsweise an der pathologischen Entwicklung des hypertrophen Herzens beteiligt. (Latronico and Condorelli, 2011). Für MIR-22 wurde gezeigt, dass sie in endothelialen Vorläuferzellen einen Alterungsprozess induziert. MIR-22 stellt daher eine Zielstruktur da, die

bei Inhibierung eine endotheliale Dysfunktion in der Angiogenese verhindern könnte (Zheng and Xu, 2014). MIR-125b wird neben den Endothelzellen u.a. auch in Immunzellen wie B-Zellen, T-Zellen und Monozyten exprimiert. Sie spielt bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle (Sonkoly and Pivarcsi, 2009). Des Weiteren inhibiert sie Endothelin-1 (Li et al., 2010), ein hochwirksamer Vasokonstriktor im Körper, der an der Blutdruckregulation beteiligt ist. Ebenfalls ist auch die MIR-663 involviert in die Entzündungsreaktion in Endothelzellen (Latronico and Condorelli, 2011), induziert durch Schubspannung (Ni et al., 2011). Weitere Untersuchungen zeigten, dass „mechanisch-sensitive“ MicroRNAs existieren, die bei Veränderungen von Flusseigenschaften im Gefäßsystem vermehrt exprimiert werden und an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind (Kumar et al.). Für die MIR-638 wurde ebenfalls gezeigt, dass sie sensitiv auf Schubspannung ist, d.h. unter diesen Bedingungen eine vermehrte Expression in Endothelzellen erfährt (Ni et al., 2011). Zusätzlich ist die MIR-638 in die Tumorgenese involviert. (Li et al., 2012). Die MIR-638 wird neben den Endothelzellen auch in den humanen Gefäßmuskelzellen exprimiert. Untersuchungen zeigen, dass sie eine Schlüsselrolle in der Regulierung der Proliferation und Migration der Gefäßmuskelzellen spielen (Li et al., 2013).

4.3. Regulation der MicroRNA-Expression durch den MR und GR in HAoECs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Regulierung der MicroRNA-Expression durch den MR bzw. den GR in HAoECs untersucht. Dabei zeigten sich insgesamt 11 verschiedene MicroRNAs, die in mindestens einem von den beiden durchgeführten MicroArrays reguliert waren. Nur 2 davon waren in beiden MicroArrays reguliert (MIR-2278, MIR-1274b). Wir untersuchten insgesamt 5 von diesen 11 Vertretern. Ausgeschlossen von der Untersuchung wurden LET-7D und MIR-345-5p, weil diese MicroRNAs nur in einem MicroArray überhaupt detektierbar waren. Des Weiteren wurden die MIR-1274a und MIR-1274b nicht weiter untersucht, weil sich diese in vivo als nicht existent erwiesen, sondern als Produkte der tRNA-Lyse gewertet wurden (Schopman et al., 2010). Ebenfalls wurde die MIR-484 sowie die MIR-1469 nicht weiter verfolgt auf Grund geringere Expressionsveränderungen in beiden MicroArrays. Die verbliebenen 5 Vertreter (MIR-21, MIR-23b, MIR-449c-3p, MIR-1908, MIR-2278) sowie zusätzlich die MIR-29b wurden in die qPCR-Untersuchungen einbezogen. Dabei war nur die Regulation für die MicroRNAs MIR-2278 reproduzierbar. Die MIR-abhängige Regulation der MIR-2278 konnte durch Reporter-Gen-Analysen bestätigt. Die Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchungen waren in den meisten Fällen nicht konform mit den MicroArray-Ergebnissen. Als ursächlich für die inhomogenen Ergebnisse (Li et al., 2013) deuten wir insbesondere die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden mit ihren Vor- und Nachteilen. Nähere Erläuterungen diesbezüglich finden sich in folgenden Ausführungen. MicroRNAs sind moderate Regulatoren der Genexpression, die eine Feinregulierung unterschiedlichster Gene der verschiedenen

Signalkaskaden und Zellmechanismen bewirken (van Rooij, 2011). Daher ist auch die gering ausgeprägten Expressionsveränderung in unseren Experimenten zu erklären. Des Weiteren nehmen wir an, dass die Regulation der MicroRNA-Expression im Gesamten von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, die wir bisher unzureichend kennen. Wie genau die Regulierung von MicroRNA durch die beiden Transkriptionsfaktoren MR und GR beeinflusst wird, kann nur vermutet werden. In neuen Untersuchungen im Nierengewebe konnte gezeigt werden, dass bestimmte MicroRNAs in der Lage sind den MR zu regulieren. Auf der anderen Seite kann der MR auch andere individuelle MicroRNAs modulieren (Butterworth, 2015).

Die MicroRNA-Biogenese ist ein komplexer Mechanismus, indem über mehrere Zwischenschritte die reife MicroRNA generiert wird. Daher kommen unterschiedliche Regulationspunkte für den MR bzw. GR infrage, die eine Regulation bewirken könnten. Zudem haben wir in unseren Experimenten nur die reife MicroRNA analysiert, sodass wir nichts darüber aussagen können, ob eine veränderte Expression bereits bei den Vorstufen ersichtlich ist. Als erster möglicher Mechanismus kann angenommen werden, dass der MR und GR in ihren Funktionen als Transkriptionsfaktoren die MicroRNA-Gene durch transkriptionelle Kontrolle beeinflussen können. Die Biosynthese und einige MicroRNA-Gene sind evolutionär hoch konserviert. Die Gene für die MicroRNAs liegen zu 50 % in nicht-kodierenden Regionen, weitere 40 % sind in Introns Protein-kodierender-Gene lokalisiert (Rodriguez et al., 2004; Saini et al., 2007). Die transkriptionelle Kontrolle der MicroRNA-Gene funktioniert vermutlich ähnlich wie bei Protein-kodierenden Genen. Dafür spricht, dass die Promotoren der MicroRNA-Gene ähnliche Charakteristika aufweisen, wie z. B. CpG-Inseln, TATA-Box, Initiatorelemente und Histonmodifikation (Cai et al., 2004; Oszolak et al., 2008). Wenn sich also die Promotoren von MicroRNA- und Protein-kodierenden Genen ähneln, ist es wahrscheinlich, dass man in Promotoren spezifischer MicroRNA-Gene (womöglich Target-MicroRNAs des MR und GR) auch das Glukokortikoid-responsive-Element finden könnte. An diesem Hormon-empfindlichen Bereich des Promotors können sowohl der MR und GR binden und Zielgene regulieren. In der Zukunft wäre es daher interessant nach GREs in den MicroRNA-Genen zu forschen.

Einige DNA-bindende Faktoren, die in der Kontrolle der MicroRNA-Expression eine Rolle spielen, sind bereits bekannt, wie c-Myc, p53, zelltypische Transkriptionsfaktoren wie MEF2, als auch Wachstumsfaktoren wie TGF- β , BNP, PDGF (Davis-Dusenbery and Hata, 2010). Des Weiteren ist der Mechanismus einer transkriptionsabhängigen Autoregulation von MicroRNAs beschrieben. Das bedeutet, dass Transkriptionsfaktoren die Expression von MicroRNAs induzieren und diese wiederum hemmend auf diese Transkriptionsfaktoren wirken (Davis and Hata, 2009). Es existieren daher komplexe regulatorische Netzwerke, welche bisher nur wenig

erforscht sind. Wir gehen davon aus, dass der MR und GR als Transkriptionsfaktoren ebenfalls eine Rolle in der Expression spezifischer MicroRNAs spielen. Vorstellbar wäre auch ein indirekter Mechanismus durch den die MicroRNA-Expression beeinflusst wird. Es ist beschrieben, dass Wachstumsfaktoren bestimmte MicroRNAs induzieren können. Beispielsweise ist der PDGF (Platelet derived growth factor) ein entscheidender Regulator in der Dedifferenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen. Glatte Gefäßmuskelzellen wechseln zwischen einem „kontraktilen“ und einen dedifferenzierten „synthetischen“ Zustand, was wichtig für die Reparatur der Gefäße nach Verletzung ist. PDGF reduziert die „kontraktilen“ Genexpression zugunsten des dedifferenzierten Zustandes, indem es u.a. die MIR-222 induziert, und erhöht damit die Migration und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Andrae et al., 2008; Davis and Hata, 2009). Auf Grund dieser Mechanismen ist es vorstellbar, dass über MR- oder GR- induzierte Expression von bestimmten Wachstumsfaktoren, diese wiederum in die MicroRNA-Expression eingreifen können. Wir wissen beispielsweise, dass der MR über nicht-genomische Signalwege an einer Transaktivierung des EGFR beteiligt ist (Grossmann et al., 2007).

Neben der Genetik rücken immer mehr epigenetische Mechanismen in den Fokus der Wissenschaft. Über verschiedene Prozesse wie Histonmodifikation oder DNA-Methylierung können bestimmte Gene inaktiviert werden. Denkbar ist so ein Mechanismus auch für den MR oder GR, wenn diese an der Expression von DNA-modifizierenden Proteinen beteiligt wären. So ist beschrieben, dass die Inhibierung der Histondeacetylase (HDAC) zu einer vermehrten Expression der MIR-1 in Krebszellen führt (Nasser et al., 2008). Für den MR oder GR ist aber bisher keine kontrollierende Wirkung auf solche Gene bekannt.

Neben der transkriptionellen Kontrolle ist auch ein Regulationseingriff in die unterschiedlichen Zwischenstufen der MicroRNA-Prozessierung vorstellbar. Wichtige Schritte sind die Prozessierung durch die 2 RNase-Enzyme Drosha und Dicer. Eine Regulierung des Enzyms Drosha und der assoziierten Proteine ist für den Wachstumsfaktor TGF- β beschrieben. Durch Bindung des Liganden TGF- β an seinen Rezeptor wird die Komplexbildung von SMAD-Proteinen (R-SMAD, Co-SMAD) intrazellulär induziert. Dieser Komplex bindet zu einer spezifischen Nukleotidsequenzen von Promotoren bestimmter Zielgene und wirkt auf die Genexpression positiv oder negativ. Zum anderen interagiert der SMAD-Komplex mit dem Drosha/DGCR8-Komplex. TGF- β stimuliert in glatten Gefäßmuskelzellen die Produktion der Pre-Mir-21, indem er die Drosha-vermittelte Prozessierung unterstützt (Davis and Hata, 2009; Davis et al., 2008). Es ist bekannt, dass der MR die Bildung von TGF- β fördert. Somit kann vermutet werden, dass der MR über diesen Mechanismus an der Regulation der Drosha-Aktivität beteiligt sein könnte. Neben dieser fördernden Wirkung auf das Drosha-Enzym sind auch

hemmende Prozesse bekannt. Es ist beschrieben, dass die Stimulierung des Estrogen- α -Rezeptors (ER- α) mit Estradiol zu einer Hemmung des Drosha-Komplexes führt (Yamagata et al., 2009). Der ER- α gehört wie der MR und GR zur Steroidrezeptorfamilie, die als nukleäre Rezeptoren wie Transkriptionsfaktoren wirken. Möglich wäre, dass der MR auch durch direkte Assoziation mit dem Drosha-Komplex in die MicroRNA-Biosynthese eingreift. Ein weiterer Regulationspunkt ist der Export der Pre-MicroRNA vom Kern ins Zytosol. Dieser Export wird unterschiedlich reguliert (Lee et al., 2008). Neben dem RNase Enzym Drosha ist natürlich auch eine Regulierung des zweiten RNase-Enzyms Dicer möglich. In diesem Schritt wird die Pre-MicroRNA in die 22-Nukleotid-lange, doppelsträngige MicroRNA prozessiert. Auch hier ist durch den MR oder GR eine Regulierung der Dicer-Aktivität über direkte Interaktion oder eine Regulierung der Dicer-Expression selbst bzw. ein Beeinflussung der AGO-Proteine denkbar. AGO-Proteine sind der Hauptbestandteil des RISC und damit wichtig für die Bindung der reifen MicroRNA an die spezifischen 3'UTR-Regionen der Zielgene. Für den GR existieren Untersuchungen, die eine direkte Regulierung der Transkription des Dicer-Enzyms zeigen (Li et al., 2014). Weiterhin denkbar wäre, dass durch bestimmte stabilisierende Proteine bzw. abbauende Enzyme, die unter dem Einfluss des GR bzw. MR stehen, den Abbau von MicroRNAs modulieren. Zusammenfassend können wir feststellen, dass eine MR-regulierte MicroRNA-Expression für die MIR-2278 in den HAoECs existiert. In den Untersuchungen von Butterworth et. al. (2015) zeigte sich für die MicroRNAs MIR-335, MIR-290 sowie MIR-198 eine MR-abhängige Regulation. Der exakte Mechanismus ist noch nicht ermittelt, es können aber verschiedenste Regulationspunkte in dem komplexen System der MicroRNA-Expression in Betracht gezogen werden (siehe Abb. 4.2).

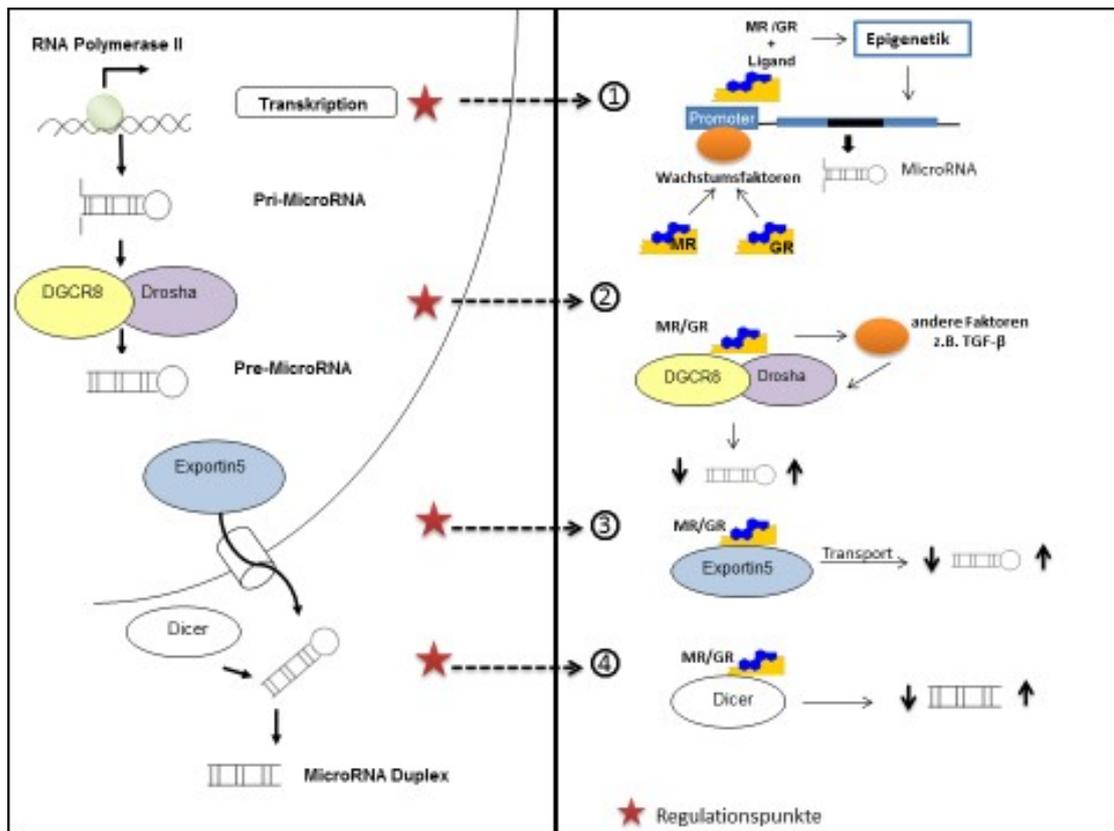


Abbildung 4.2: Modell über die möglichen Regulationspunkte des MR und GR in der MicroRNA-Expression

- 1) *Transkriptionelle Kontrolle:* Der MR und GR beeinflussen die Transkription der MicroRNA-Gene durch direkte Bindung an spezifischen Promotoren bzw. indirekt durch Induzierung von Wachstumsfaktoren, die mit der DNA interagieren.
- 2) *Drosha-Kontrolle:* Der MR und GR beeinflussen das Drosha-Enzym über direkte Interaktion, bzw. indirekt über Induzierung von Faktoren, die das Drosha-Enzym regulieren.
- 3) *Export-Kontrolle:* Der MR und GR beeinflussen den Export von MicroRNAs.
- 4) *Dicer-Kontrolle:* Der MR und GR beeinflussen das Dicer-Enzym entweder über indirekte Interaktion mit dem Dicer-Enzym oder indirekt durch Regulierung von anderen Dicer-kontrollierenden Faktoren.

4.4. Die Bedeutung der MIR-2278 in HAoECs

Für die MIR-2278 stellte sich in beiden durchgeführten MicroArrays eine vermehrte Expression durch den MR und GR dar. Die gesteigerte Expression konnten wir in den nachfolgenden RT-PCR-Experimenten mit dem spezifischen TaqMan-System nur für den MR signifikant reproduziert werden. Daher erfolgte die weitere Validierung durch einen Reporter-gen-Assay, in dem eine vermehrte MicroRNA-Expression der MIR-2278, durch den MR induziert, bestätigt

werden konnte. Unsere Datenbankrecherche nach möglichen Targets der MIR-2278 ergab, dass der GR (NR3C1) ein mögliches Target darstellt. Jedoch wurde diese Vorhersage nur von einer Datenbank getroffen, der MIRDB. Würde dies zutreffen, dann könnte dies einen Aspekt darstellen, der die MR-Spezifität erklärt. Denkbar wäre, dass der MR Liganden-aktiviert die MIR-2278 hochreguliert und diese dann wiederum die mRNA des GR abbaut bzw. inhibiert (siehe Abb. 4.3).

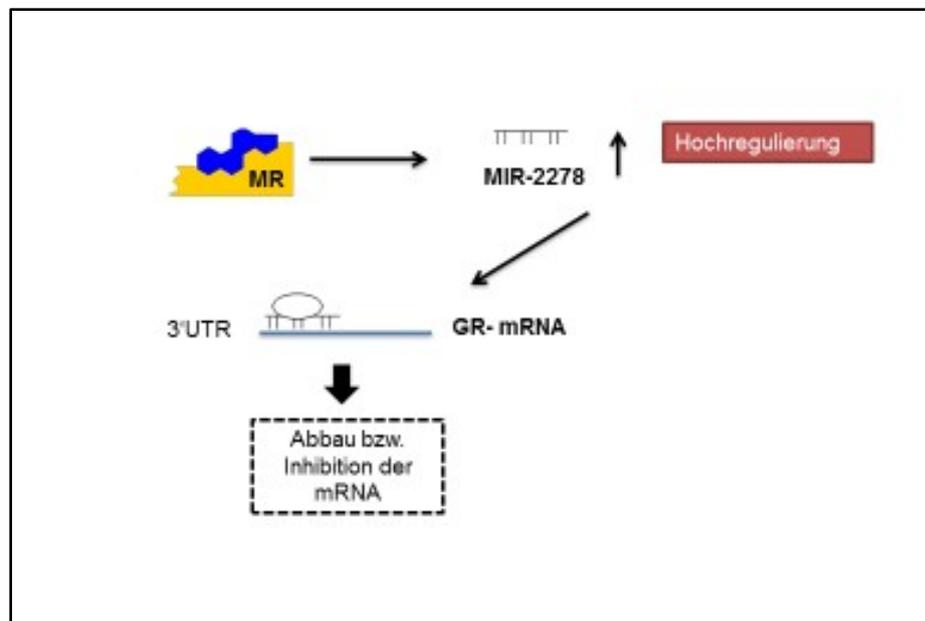


Abbildung 4.3: Modell der möglichen Rolle der MIR-2278 in der Regulation der MR- und GR-Selektivität in den HAoECs

MR-Spezifität: Durch MR-induzierte vermehrte Expression der MIR-2278 wird die mRNA des GR abgebaut bzw. inhibiert, womit die MR-Spezifität begünstigt werden würde. Auf der anderen Seite sagt die Datenbank MiRanda den MR (NR3C2) als mögliches Zielgen voraus. Wie bereits oben diskutiert, finden wir in den HAoECs eine Aldosteron-induzierte erhöhte Expression des MR, die wahrscheinlich MR-abhängig ist. Diese These wird durch weitere Experimente mit dem MR-Antagonisten Canrenoat unterstützt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit Aldosteron und Canrenoat nicht zu einer vermehrten Expression des MR führt. Wenn wir also davon ausgehen, dass der MR die MIR-2278 hochreguliert, könnte diese der vermehrten MR-Expression entgegenwirken und die mRNA des MR inhibieren. Diese negative Rückkopplung könnte einen protektiven Effekt auf die Endothelzellen haben. Denn wir wissen, dass der MR an vielen pathophysiologischen Vorgängen beteiligt ist. U.a. induziert der MR im pathologischen Sinne die Bildung von inflammatorischen Proteinen, die zu einer Entzündungsreaktion und

Fibrose des Gefäßsystems führen. Um den möglichen protektiven Charakter der MIR-2278 zu unterstützen, sei erwähnt, dass auch Target-mRNAs von 2 unabhängigen Datenbanken vorausgesagt wurden (siehe Tabelle 3.3), die eine Rolle bei Entzündungsvorgängen spielen (z.B. CSF1). Des Weiteren wissen wir, dass die MR-induzierten pathophysiologischen Veränderungen im renal-kardiovaskulären System auch auf veränderten Elektrolytkonzentrationen beruhen. Daher erscheint es interessant, dass auch hierfür entsprechende Targets der MIR-2278 vorausgesagt wurden, wie der Natriumaustauscher (SLC9A6) und der Kaliumkanal (KCNH2). Ein weiteres mögliches Target der MIR-2278 ist das Growth Factor Receptor binding protein 7 (GRB7), welches mit dem EGFR interagiert und diesen positiv beeinflusst. Der EGFR ist ebenfalls in die Pathophysiologie des MR involviert. Der EGFR-Promoter wird durch den MR stimuliert, der EGFR wiederum induziert die Bildung von extrazellulären Matrixproteinen, wie z.B. Fibronectin. Zusammenfassend können wir vermuten, dass die MIR-2278 möglicherweise in Mechanismen involviert ist, die entscheidend für MR-Spezifität und MR-Pathophysiologie sind (siehe Abb. 4.4).

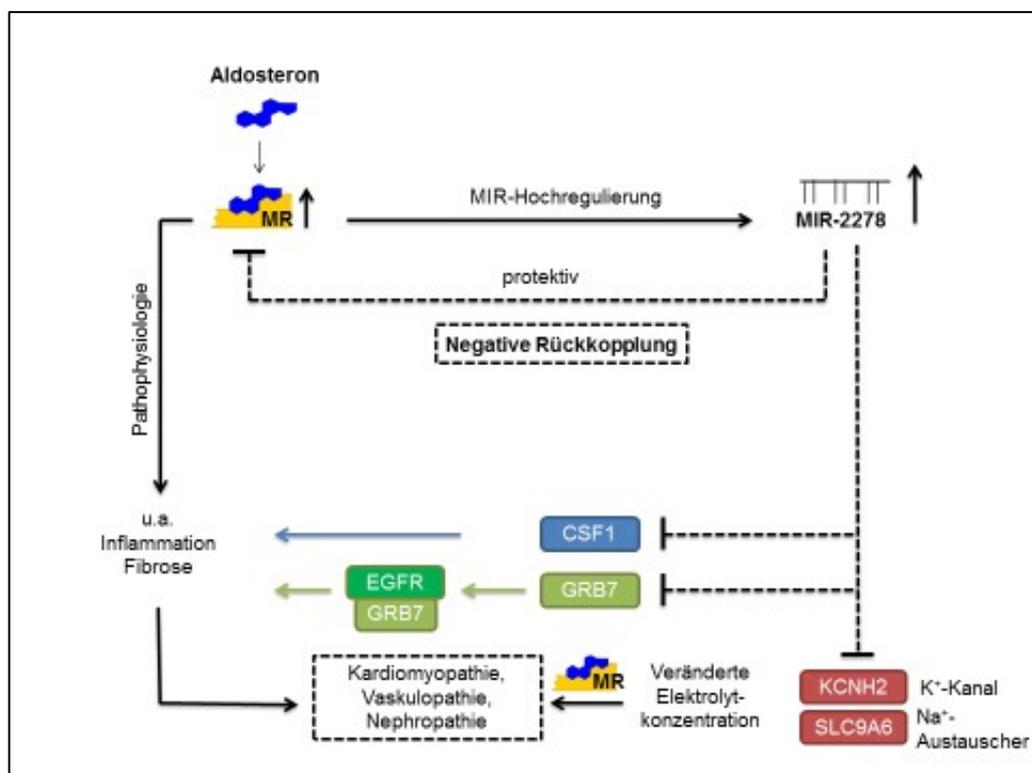


Abbildung 4.4: Modell der möglichen Rolle der MIR-2278 in der MR-Pathophysiologie in den HAoECs

MR-Pathophysiologie-Modell:

- A) Die MR-induzierte vermehrte Expression der MIR-2278 könnte zu einer vermehrten Inhibierung bzw. Abbau der MR-mRNA im Sinne einer negativen Rückkopplung bedingen.
- B) Die MIR-2278 könnte protektiv wirken über die Inhibierung inflammatorischer Zielgene.
- C) Die MIR-2278 könnte protektiv wirken über die Inhibierung von Target-Genen, die in die Regulierung von Elektrolytkonzentration involviert sind. Veränderte Elektrolytkonzentrationen spielen bei pathophysiologischen Prozessen wie der Kardiomyopathie, Nephropathie und Vaskulopathie eine Rolle.
- D) Die MIR-2278 könnte protektiv über Inhibierung des EGFR-interagierenden Proteins GRB7 wirken.

4.5. Bewertung der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zur MicroRNA-Expression

Die Untersuchung der MicroRNA-Expression ist technisch anspruchsvoll. Dies ist durch unterschiedliche Faktoren bedingt (Benes and Castoldi, 2010):

1. Die MicroRNAs sind sehr kleine RNAs mit einer Länge von 22 Nukleotiden, im Vergleich dazu besteht die mRNA aus 20-100 Nukleotiden.
2. Die MicroRNAs haben einen heterogenen Anteil an Guanin-Cytosin-Gehalt, was eine unterschiedliche Schmelztemperatur der cDNA bedingt.
3. Der reifen MicroRNA fehlen gemeinsame Merkmale, die eine selektive Aufreinigung erleichtern, wie beispielsweise eine Poly-Adenylierung, wie man sie von der mRNA kennt.
4. Die Zielsequenz der MicroRNA ist sowohl in den Vorstufen der Pri-MicroRNA und der Pre-MicroRNA, als auch in der reifen MicroRNA enthalten, was eine Differenzierung zwischen den einzelnen Vorstufen schwierig macht.
5. MicroRNAs, die zu einer Familie gehören (z.B. die Let-7-Familie), unterscheiden sich häufig nur in einer Nukleotidsequenz.

Als Nachweismethoden für die MicroRNAs stehen MicroArray-Analysen, Sequenzierung, RT-PCR sowie das Northern Blotting zur Verfügung. Die MicroArray-Analysen und die Sequenzierungsmethode eignen sich dabei insbesondere, um parallel eine große Anzahl von unterschiedlichen MicroRNAs zu untersuchen. Demgegenüber kann man mit dem Northern Blot und der RT-PCR individuelle MicroRNAs sehr sensitiv und spezifisch nachweisen (van Rooij, 2011). Häufig sind in den Methoden nur kleine MicroRNA-Expressionsveränderungen

nachweisbar. Der Effekt beruht darauf, dass eine MicroRNA viele Ziel-mRNAs hat und wiederum an einer individuellen mRNA unterschiedliche MicroRNAs angreifen können. Wir verwendeten zunächst die MicroArray-Analysen zur Untersuchung der Regulation der MicroRNA-Expression durch den MR oder GR. Wir konnten daher aus einer hohen Anzahl möglicher regulierter MicroRNAs 11 Vertreter herausfiltern, von denen wir einen Teil weiter untersuchten. Wie schon beschrieben, ist die Methode der MicroArray-Analysen weniger spezifisch und sensitiv als die RT-PCR (Benes and Castoldi, 2010), was dazu führte, dass wir nur für die MIR-2278 eine Regulation reproduzieren konnten. Folgende Schwächen müssen bei der MicroArray-Untersuchung berücksichtigt werden: Für die Analyse wurde isolierte RNA eingeschickt, dabei enthält die RNA-Probe etwa nur 0,01 % kleine RNAs, je größer daher die quantitative RNA-Menge ist, desto sensitiver sind die Ergebnisse der MicroArrays. Anzumerken ist, dass bei der RNA-Isolation aus den HAoECs immer nur sehr geringe Mengen gewonnen werden konnten, was sicherlich eine Rolle bei der Inhomogenität der Ergebnisse spielt. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass wir unterschiedliche Passagen der kultivierten Primärzellen verwendeten, sodass auch Passagen-abhängige Effekte bedacht werden müssen. Ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass die MicroRNAs unterschiedliche Schmelztemperaturen besitzen, sodass bei einer einzigen Hybridisierungstemperatur der MicroArray-Experimente, MicroRNAs mit einer niedrigen Schmelztemperatur geringere Signale erzeugen und MicroRNAs mit einer höheren Schmelztemperatur dementsprechend eine vermehrte Signalintensität zeigen. Dies bedingt ebenfalls eine geringere Sensitivität und Spezifität der MicroArray-Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der MicroArray eine gute Screeningmethode darstellt, aber einer weiteren Validierung durch andere Methoden bedarf. Die am meisten verwendete Methode ist dafür die RT-PCR, hierbei existieren unterschiedlich sensitive Verfahren. Wir verwendeten zu Beginn unserer Validierung die SybrGreen-Methode (MiScript-System), hierbei wird zunächst die Reverse Transkription zur Herstellung einer cDNA durchgeführt. Bei der PCR kommen dann ein MicroRNA-spezifischer Forward-Primer sowie ein universeller Reverse-Primer zum Einsatz. Diese linearen Primer haben allerdings den Nachteil, dass sie nicht zwischen der reifen MicroRNA und MicroRNA-Vorstufen differenzieren können. Die RT-PCR basiert auf einer Detektion von fluoreszierenden Reportermolekülen, deren Signalintensität mit der amplifizierten Menge der DNA während jedes Zyklus korreliert. SybrGreen ist ein interkalierender Farbstoff, dessen Fluoreszenz um etwa 100fach ansteigt, wenn er mit doppelsträngiger DNA in Verbindung kommt. Allerdings kann SybrGreen nicht zwischen den unterschiedlichen PCR-Produkten unterscheiden, sodass auch unspezifische PCR-Produkte wie z.B. Primer-Dimere und damit falsch-positive Ergebnisse erzielt werden. Dies stellt einen weiteren Nachteil der Methode dar und kann die Diskrepanz zu der TaqMan-Methode erklären.

Diese Methode verwendeten wir in unseren späteren Experimenten. Bei der TaqMan RT-PCR wird bei der Reversen Transkription ein Stem-Loop-Primer verwendet. Dieser Stem-Loop-Primer enthält einen kurzen einzelsträngigen Teil, der zu dem 3'Ende der MicroRNA komplementär ist. Zusätzlich beinhaltet der Primer einen doppelsträngigen Teil mit dem Loop, welches die universale Primer-Bindungssequenz darstellt. Stem-Loop-Primer sind sehr schwierig zu designen, haben aber den Vorteil, dass sie nicht an die MicroRNA-Vorstufen binden und somit eine höhere Spezifität erreichen (Benes and Castoldi, 2010). Bei der PCR kommen ein MicroRNA-spezifischer Forward-Primer sowie ein universeller Reverse-Primer zum Einsatz. Des Weiteren wird eine spezifische TaqMan-Sonde verwendet. Diese TaqMan-Sonde besteht aus Oligonukleotiden, die am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff enthalten und am 3'-Ende einen Quencher, der bei Intaktheit der Sonde, die Freisetzung der Fluoreszenz verhindert. Bindet die TaqMan-Sonde an ihre spezifische Zielsequenz wird sie durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase hydrolysiert und es kann die Fluoreszenz gemessen werden, die mit der Menge der PCR-Produkte korreliert. Dieses Verfahren ist sehr spezifisch. Im Gegensatz zur SybrGreen-Methode werden dabei keine unspezifischen Amplifikationsprodukte oder Primer-Dimere gebildet. Ein weiterer Vorteil gegenüber SybrGreen ist, dass bereits RNA-Mengen im Nanogramm-Bereich ausreichen um die TaqMan-Untersuchungen durchzuführen (Chen et al., 2009). Nachteilig ist der hohe Kosten- und Zeitaufwand bei dieser Methode, da jede MicroRNA eine spezifische Reverse Transkription Reaktion sowie eine spezifische TaqMan-Sonde benötigt. Allerdings wird die TaqMan-Methode mit der hohen Spezifität und Sensitivität als „Goldstandard“ der RT-PCR in der MicroRNA-Untersuchung gesehen (Luo et al., 2011). Nach der Detektion von regulierenden MicroRNAs ist die Untersuchung der Funktion dieser MicroRNAs von Interesse, sodass die Suche nach Zielsequenzen dieser spezifischen MicroRNAs in bioinformatischen Datenbanken folgt. Aktuell existieren verschiedene Programme zur Vorhersage möglicher Zielstrukturen, die unterschiedliche Charakteristika nutzen, um mögliche Zielgene zu identifizieren. Daher kommt man in der Folge auch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Um daher eine hohe Spezifität und geringe Sensitivität zu erreichen, sollten mehrere Ergebnisse aus unterschiedlichen Datenbanken kombiniert werden, um nach Übereinstimmungen zu suchen. Wir verwendeten in unseren bioinformatischen Analysen daher 2 Datenbanken zur Suche nach möglichen Targets (van Rooij, 2011). Um eine bestimmte MicroRNA-Regulation weiter zu verifizieren, stehen *in vitro* Untersuchungen zur Verfügung. Wir versuchten mittels eines Luciferase-Reportergen-Assays, die Regulation der MIR-2278 durch den MR zu bestätigen. Ziel war es, dass die MIR-2278 an diese Stelle bindet und damit die Reportergenaktivität reduziert. Die Reduktion der Lumineszenz der Luciferase konnte dann gemessen werden. Allerdings wurde dies nicht an den HAOECs sondern in den EA-hy.926-Zellen vorgenommen. Da die MicroRNA-

Regulation häufig zellspezifisch ist, muss dies bei der Betrachtung berücksichtigt werden. Reporter-Gen-Assays werden genutzt, um bestimmte Zielgene weiter zu validieren oder die MicroRNA-Expression quantitativ zu messen. Das gängige Prinzip besteht darin 3'UTRs oder Teile davon bzw. auch nur doppelsträngige Oligonukleotide an das 3' Ende von Reporter-Genen wie z.B. die Luciferase zu klonieren. Zur Validierung einer großen Anzahl von MicroRNAs ist dieser Ansatz allerdings sehr aufwendig und unpraktikabel.

5. Zusammenfassung

Der MR ist entscheidend an der Blutdruckregulation und dem Elektrolythaushalt im menschlichen Körper beteiligt. Pathophysiologische Effekte des MR bewirken u.a. eine Entzündungsreaktion und Fibrose im renokardiovaskulären System. Der GR ist eng verwandt mit dem MR und weist viele Sequenzhomologien auf, jedoch bewirken beide Rezeptoren unterschiedliche Effekte. Wie die MR-Spezifität gegenüber dem GR reguliert wird, ist ebenfalls wenig aufgeklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch MicroRNAs. MicroRNAs sind kleine ca. 22-Nukleotid-lange RNAs, die an der Regulierung von mindestens 30 % unserer Gene über eine posttranskriptionelle Regulation beteiligt sind. Diese MicroRNAs werden zell-, gewebs- sowie krankheitsspezifisch exprimiert. Viele MicroRNA-Gene sind hoch konserviert, wie genau die MicroRNA-Gene reguliert werden, ist im Einzelnen noch ungenügend untersucht. Des Weiteren ist die MicroRNA-Biogenese, die über mehrere Stufen bis zur Bildung der reifen MicroRNA erfolgt, hoch komplex. Um die MicroRNA-Expression zu beeinflussen, sind daher viele mögliche Regulierungspunkte denkbar. Daher sollte in dieser Arbeit die Fragestellung bearbeitet werden, ob der MR oder der GR als nukleäre Rezeptoren auch bestimmte MicroRNAs regulieren können. Neben der Untersuchung einer Regulation der MicroRNA-Expression durch den MR bzw. GR, sollte auch geforscht werden, ob dies einen weiteren Aufschluss über die pathophysiologischen Vorgängen des MR sowie die MR/GR-Spezifität liefert. In der Pathophysiologie des MR spielen Endothelzellen eine entscheidende Rolle, sodass wir für unsere Experimente humane aortale Endothelzellen in Primärkultur verwendeten.

Es erfolgte zunächst der Nachweis, dass diese Zellen den MR und GR endogen exprimieren. Für die Erforschung der MicroRNA-Expression führten wir zunächst MicroRNA-MicroArray-Analysen durch, um aus einer Vielzahl von MicroRNAs mögliche durch den MR- bzw. GR-regulierte MicroRNAs zu screenen (MIRBase Version 12.0). Hierbei zeigten sich 11 mögliche Vertreter, von denen 5 weiter untersucht wurden. Des Weiteren konnten wir ein basales MicroRNA-Expressionsprofil für die HAoECs erstellen. Eine Validierung der MicroArray-Ergebnisse wurde mittels RT-PCR-Analysen durchgeführt. Zunächst erfolgten die Experimente

mit der weniger spezifischen SybrGreen-Methode, dann wurde in späteren Untersuchungen die TaqMan-Methode verwendet. In diesen Untersuchungen konnte nur für die MIR-2278 das Ergebnis der MicroArrays reproduziert werden und eine Regulation durch den MR nachgewiesen werden. Um diesen Effekt des MR auf die MIR-2278 weiter zu validieren, führten wir Reporteranalysen mit einem entsprechenden Reportergenkonstrukt durch, welches eine Bindungsstelle der MIR-2278 sowie ein damit gekoppeltes Luciferase-Gen enthielt. Hierbei konnte die Regulation der MIR-2278 durch den MR bestätigt werden. Weiterhin wurden bioinformatische Analysen vorgenommen, um eventuelle Zielgene der MIR-2278 zu finden. Hierfür wurden unterschiedliche Datenbanken genutzt. In einer Datenbank zeigte sich die GR-mRNA als Zielstruktur für die MIR-2278. Durch eine vermehrte Expression der MIR-2278 durch den MR könnte daher durch Inhibierung des GR die MR-Spezifität mit bedingt sein. Eine andere Datenbank zeigt die MR-mRNA als Target auf. Daher ist durch eine MR-induzierte Regulierung der MIR-2278 eine Inhibierung des MR selbst im Sinne einer negativen Rückkopplung möglich. Die weitere Suche der bioinformatischen Datenbanken erbrachte inflammatorische Zielgene als Zielstruktur, sodass die MIR-2278 eine protektive Rolle in den HAoECs spielen könnte gegenüber dem pathophysiologischen Einfluss des MR auf das renovaskuläre System. In der Zukunft sollten diese Zielgene weiter validiert werden, um neue Erkenntnisse zur Rolle der MIR-2278 zu erlangen.

6. Literaturverzeichnis

- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22:1276-1312.
- Armanini D, Witzgall H, Wehling M, Kuhnle U, Weber PC. 1987. Aldosterone receptors in different types of primary hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 65:101-104.
- Armanini D, Zennaro CM, Martella L, Scali M, Pratesi C, Grella PV, Mantero F. 1992. Mineralocorticoid effector mechanism in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 74:946-949.
- Bang C, Fiedler J, Thum T. Cardiovascular importance of the microRNA-23/27/24 family. *Microcirculation* 19:208-214.
- Benes V, Castoldi M. 2010. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50:244-249.
- Bens M, Vallet V, Cluzeaud F, Pascual-Letallec L, Kahn A, Rafestin-Oblin ME, Rossier BC, Vandewalle A. 1999. Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel immortalized mouse collecting duct principal cell line. *J Am Soc Nephrol* 10:923-934.
- Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ. 2001. The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* 142:1587-1594.
- Binart N, Lombes M, Rafestin-Oblin ME, Baulieu EE. 1991. Characterization of human mineralocorticosteroid receptor expressed in the baculovirus system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10681-10685.
- Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Holste A, Hafner M, Tuschl T, Bosio A. 2009. Absolute quantification of microRNAs by using a universal reference. *RNA* 15:2375-2384.
- Brennan FE, Fuller PJ. 1999. Acute regulation by corticosteroids of channel-inducing factor gene messenger ribonucleic acid in the distal colon. *Endocrinology* 140:1213-1218.
- Brennan FE, Fuller PJ. 2006. Mammalian K-ras2 is a corticosteroid-induced gene in vivo. *Endocrinology* 147:2809-2816.
- Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. 1994. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 26:809-820.
- Buckingham JC. 2006. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S258-268.
- Butterworth MB. 2015. MicroRNAs and the regulation of aldosterone signaling in the kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 308:C521-527.
- Cachofeiro V, Miana M, de Las Heras N, Martin-Fernandez B, Ballesteros S, Fernandez-Tresguerres J, Lahera V. 2008. Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:331-335.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957-1966.
- Castren M, Patchev VK, Almeida OF, Holsboer F, Trapp T, Castren E. 1995a. Regulation of rat mineralocorticoid receptor expression in neurons by progesterone. *Endocrinology* 136:3800-3806.
- Castren M, Trapp T, Berninger B, Castren E, Holsboer F. 1995b. Transcriptional induction of rat mineralocorticoid receptor gene in neurones by corticosteroids. *J Mol Endocrinol* 14:285-293.
- Chen C, Chai H, Wang X, Jiang J, Jamaluddin MS, Liao D, Zhang Y, Wang H, Bharadwaj U, Zhang S, Li M, Lin P, Yao Q. 2008. Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* 112:3205-3216.
- Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. 1999. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2514-2519.

- Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK. 2009. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics* 10:407.
- Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. 2007. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 170:1831-1840.
- Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1:581-585.
- Connell JM, MacKenzie SM, Freel EM, Fraser R, Davies E. 2008. A lifetime of aldosterone excess: long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function. *Endocr Rev* 29:133-154.
- Davis-Dusenbery BN, Hata A. 2010. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 148:381-392.
- Davis BN, Hata A. 2009. Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 7:18.
- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. 2008. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454:56-61.
- de Kloet ER, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E. 2009. Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res* 1293:129-141.
- Delcayre C, Swynghedauw B. 2002. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 34:1577-1584.
- Divakaran V, Mann DL. 2008. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res* 103:1072-1083.
- Dotz C, Wellhoner JP, Schutt M, Sayk F. 2009. [Glucocorticoids and hypertension]. *Internist (Berl)* 50:36-41.
- Epple HJ, Amasheh S, Mankertz J, Goltz M, Schulzke JD, Fromm M. 2000. Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G718-724.
- Escoubet B, Coureau C, Blot-Chabaud M, Bonvalet JP, Farman N. 1996. Corticosteroid receptor mRNA expression is unaffected by corticosteroids in rat kidney, heart, and colon. *Am J Physiol* 270:C1343-1353.
- Farman N, Rafestin-Oblin ME. 2001. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F181-192.
- Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F. 2008. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 283:15878-15883.
- Fejes-Toth G, Naray-Fejes-Toth A. 2007. Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: clues to cardiac remodeling? *Endocrinology* 148:1502-1510.
- Funder JW. 1993. Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science* 259:1132-1133.
- Gekle M, Grossmann C. 2009. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Arch* 458:231-246.
- Griffiths-Jones S. 2006. miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol* 342:129-138.
- Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. 2007. Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E1790-1800.
- Guaraldi F, Salvatori R. 2012. Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease. *J Am Board Fam Med* 25:199-208.

- Heusschen R, van Gink M, Griffioen AW, Thijssen VL. 2010. MicroRNAs in the tumor endothelium: novel controls on the angioregulatory switchboard. *Biochim Biophys Acta* 1805:87-96.
- Kassahn KS, Ragan MA, Funder JW. 2011. Mineralocorticoid receptors: evolutionary and pathophysiological considerations. *Endocrinology* 152:1883-1890.
- Kolla V, Litwack G. 2000. Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Biochem* 204:35-40.
- Krozowski Z. 1999. The 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: functions and physiological effects. *Mol Cell Endocrinol* 151:121-127.
- Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. 2007. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101:59-68.
- Kumar S, Kim CW, Simmons RD, Jo H. Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2206-2216.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735-739.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. 2007. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129:1401-1414.
- Latronico MV, Condorelli G. 2011. microRNAs in hypertrophy and heart failure. *Exp Biol Med* (Maywood) 236:125-131.
- Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. 2008. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA* 14:35-42.
- Leopold JA, Dam A, Maron BA, Scribner AW, Liao R, Handy DE, Stanton RC, Pitt B, Loscalzo J. 2007. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med* 13:189-197.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15-20.
- Li D, Wang Q, Liu C, Duan H, Zeng X, Zhang B, Li X, Zhao J, Tang S, Li Z, Xing X, Yang P, Chen L, Zeng J, Zhu X, Zhang S, Zhang Z, Ma L, He Z, Wang E, Xiao Y, Zheng Y, Chen W. 2012. Aberrant expression of miR-638 contributes to benzo(a)pyrene-induced human cell transformation. *Toxicol Sci* 125:382-391.
- Li D, Yang P, Xiong Q, Song X, Yang X, Liu L, Yuan W, Rui YC. 2010. MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J Hypertens* 28:1646-1654.
- Li P, Liu Y, Yi B, Wang G, You X, Zhao X, Summer R, Qin Y, Sun J. 2013. MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc Res* 99:185-193.
- Li R, Jia Y, Zou H, Zhao R. 2014. Breed-specific expression of DROSHA, DICER and AGO2 is regulated by glucocorticoid-mediated miRNAs in the liver of newborn piglets. *Anim Genet* 45:817-826.
- Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D. 1995. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12480-12484.
- Lombes M, Binart N, Delahaye F, Baulieu EE, Rafestin-Oblin ME. 1994a. Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem J* 302 (Pt 1):191-197.

- Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. 1994b. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 135:834-840.
- Lu NZ, Cidlowski JA. 2004. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci* 1024:102-123.
- Luo X, Zhang J, Wang H, Du Y, Yang L, Zheng F, Ma D. 2011. PolyA RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe. *Biotechnol Lett* 34:627-633.
- Masilamani S, Kim GH, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. 1999. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104:R19-23.
- Meinel S, Ruhs S, Schumann K, Stratz N, Trenkmann K, Schreier B, Grosse I, Keilwagen J, Gekle M, Grossmann C. 2013. Mineralocorticoid receptor interaction with SP1 generates a new response element for pathophysiologically relevant gene expression. *Nucleic Acids Res* 41:8045-8060.
- Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, Constantine-Paton M, Horvitz HR. 2004. Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 5:R68.
- Morrison N, Harrap SB, Arriza JL, Boyd E, Connor JM. 1990. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum Genet* 85:130-132.
- Munier M, Meduri G, Viengchareun S, Leclerc P, Le Menuet D, Lombes M. 2010. Regulation of mineralocorticoid receptor expression during neuronal differentiation of murine embryonic stem cells. *Endocrinology* 151:2244-2254.
- Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Yoshizumi M, Nishiyama A. 2005. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 46:1039-1045.
- Nakamura Y, Suzuki S, Suzuki T, Ono K, Miura I, Satoh F, Moriya T, Saito H, Yamada S, Ito S, Sasano H. 2006. MDM2: a novel mineralocorticoid-responsive gene involved in aldosterone-induced human vascular structural remodeling. *Am J Pathol* 169:362-371.
- Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G. 1999. *sgk* is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na^+ channels. *J Biol Chem* 274:16973-16978.
- Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, Motiwala T, Majumder S, Wang B, Suster S, Jacob ST, Ghoshal K. 2008. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem* 283:33394-33405.
- Ni CW, Qiu H, Jo H. 2011. MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:H1762-1769.
- Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee JD, Yoshino O, Lin S, Han J. 2008. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest* 118:1944-1954.
- Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. 2008. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev* 22:3172-3183.
- Pascual-Le Tallec L, Demange C, Lombes M. 2004. Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *Eur J Endocrinol* 150:585-590.
- Pascual-Le Tallec L, Lombes M. 2005. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol* 19:2211-2221.

- Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ, Lombes M. 2005. The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol Endocrinol* 19:1158-1169.
- Pearce D. 1994. A mechanistic basis for distinct mineralocorticoid and glucocorticoid receptor transcriptional specificities. *Steroids* 59:153-159.
- Pearce D, Yamamoto KR. 1993. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor activities distinguished by nonreceptor factors at a composite response element. *Science* 259:1161-1165.
- Pitt B. 2004. Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEsus studies. *Mol Cell Endocrinol* 217:53-58.
- Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341:709-717.
- Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G. 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108:3068-3071.
- Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Yla-Herttuala S. 2008. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett* 582:2397-2401.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14:1902-1910.
- Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. 2004. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol* 217:203-212.
- Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17719-17724.
- Schopman NC, Heynen S, Haasnoot J, Berkhout B. 2010. A miRNA-tRNA mix-up: tRNA origin of proposed miRNA. *RNA Biol* 7:573-576.
- Sen CK, Gordillo GM, Khanna S, Roy S. 2009. Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. *J Vasc Res* 46:527-540.
- Small EM, Frost RJ, Olson EN. 2010. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 121:1022-1032.
- Small EM, Olson EN. 2011. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 469:336-342.
- Sober S, Laan M, Annilo T. 2010. MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem Biophys Res Commun* 391:727-732.
- Sonkoly E, Pivarcsi A. 2009. microRNAs in inflammation. *Int Rev Immunol* 28:535-561.
- Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, Pearce D. 2005. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem* 280:39970-39981.
- Struthers AD. 2004. Aldosterone in heart failure: pathophysiology and treatment. *Curr Heart Fail Rep* 1:171-175.
- Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. 2007. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 100:1164-1173.
- Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Gerber SA, Harrison KD, Pober JS, Iruela-Arispe ML, Merkenschlager M, Sessa WC. 2008. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14082-14087.
- Sugiyama T, Yoshimoto T, Hirono Y, Suzuki N, Sakurada M, Tsuchiya K, Minami I, Iwashima F, Sakai H, Tateno T, Sato R, Hirata Y. 2005a. Aldosterone increases osteopontin gene expression in rat endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336:163-167.

- Sugiyama T, Yoshimoto T, Tsuchiya K, Gochou N, Hirono Y, Tateno T, Fukai N, Shichiri M, Hirata Y. 2005b. Aldosterone induces angiotensin converting enzyme gene expression via a JAK2-dependent pathway in rat endothelial cells. *Endocrinology* 146:3900-3906.
- Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H. 2000. Sodium-induced cardiac aldosterone synthesis causes cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 141:1901-1904.
- Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, Holsboer F. 1994. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13:1457-1462.
- Uchida S, Nishida A, Hara K, Kamemoto T, Suetsugi M, Fujimoto M, Watanuki T, Wakabayashi Y, Otsuki K, McEwen BS, Watanabe Y. 2008. Characterization of the vulnerability to repeated stress in Fischer 344 rats: possible involvement of microRNA-mediated down-regulation of the glucocorticoid receptor. *Eur J Neurosci* 27:2250-2261.
- Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79:581-588.
- van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, van Rossum EF, Emonts M, Han KH, Wouters JM, Hazes JM, Lamberts SW, Feelders RA. 2010. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12:R159.
- van Rooij E. 2011. The art of microRNA research. *Circ Res* 108:219-234.
- Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. 2007. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 5:e012.
- Viengchareun S, Penfornis P, Zennaro MC, Lombes M. 2001. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors inhibit UCP expression and function in brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E640-649.
- Wald H, Goldstein O, Asher C, Yagil Y, Garty H. 1996. Aldosterone induction and epithelial distribution of CHIF. *Am J Physiol* 271:F322-329.
- Wang HW, Huang TS, Lo HH, Huang PH, Lin CC, Chang SJ, Liao KH, Tsai CH, Chan CH, Tsai CF, Cheng YC, Chiu YL, Tsai TN, Cheng CC, Cheng SM. 2014a. Deficiency of the microRNA-31-microRNA-720 pathway in the plasma and endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:857-869.
- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2008. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 15:261-271.
- Wang X, Kuang Y, Shen X, Zhou H, Chen Y, Han Y, Yuan B, Zhou J, Zhao H, Zhi Q, Xue X. 2014b. Evaluation of miR-720 prognostic significance in patients with colorectal cancer. *Tumour Biol*.
- Wong S, Brennan FE, Young MJ, Fuller PJ, Cole TJ. 2007. A direct effect of aldosterone on endothelin-1 gene expression in vivo. *Endocrinology* 148:1511-1517.
- Wu F, Yang Z, Li G. 2009. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 386:549-553.
- Wurdinger T, Tannous BA, Saydam O, Skog J, Grau S, Soutschek J, Weissleder R, Breakefield XO, Krichevsky AM. 2008. miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell* 14:382-393.
- Yamagata K, Fujiyama S, Ito S, Ueda T, Murata T, Naitou M, Takeyama K, Minami Y, O'Malley BW, Kato S. 2009. Maturation of microRNA is hormonally regulated by a nuclear receptor. *Mol Cell* 36:340-347.
- Yuan J, Jia R, Bao Y. 2007. Aldosterone up-regulates production of plasminogen activator inhibitor-1 by renal mesangial cells. *J Biochem Mol Biol* 40:180-188.
- Yudt MR, Cidlowski JA. 2002. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 16:1719-1726.

- Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F, Fuller PJ. 1995. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J Biol Chem* 270:21016-21020.
- Zennaro MC, Le Menuet D, Lombes M. 1996. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol Endocrinol* 10:1549-1560.
- Zheng Y, Xu Z. 2014. MicroRNA-22 induces endothelial progenitor cell senescence by targeting AKT3. *Cell Physiol Biochem* 34:1547-1555.

7. Tabellenanhang

Tabelle 7.1: Übersicht über induzierte MicroRNAs nach Inkubation mit Aldosteron und Dexamethason

GeneID	MicroRNA Name	Aldo	Dexa
35847	HSA-MIR-140-5P	0,07	0,04
35857	HSA-MIR-148A	0,25	0,16
35862	HSA-MIR-153	0,34	0,20
35864	HSA-MIR-15A	0,50	0,34
35864	HSA-MIR-15A		0,20
35882	HSA-MIR-208A		0,29
35883	HSA-MIR-21	1,12	3,79
35914	HSA-MIR-377	0,13	0,08
35925	HSA-MIR-9*	0,46	0,16
35927	HSA-MIR-96	0,18	0,09
38315	HSA-LET-7F	0,18	0,27
38334	HSA-MIR-218		0,31
38340	HSA-MIR-302B		0,28
38343	HSA-MIR-325	0,33	0,24
38350	HSA-MIR-367		0,57
38357	HSA-MIR-376B	0,21	0,14
38358	HSA-MIR-380-3P		0,34
38363	HSA-MIR-424		0,32
38365	HSA-MIR-429	0,11	0,07
38385	HSA-MIR-507		0,27
38387	HSA-MIR-511		0,29
38389	HSA-MIR-515-5P	0,22	0,18
38390	HSA-MIR-517C	0,12	0,07
38395	HSA-MIR-521	0,17	0,11
38399	HSA-MIR-548A-3P		0,30
38400	HSA-MIR-548B-3P	0,47	0,27
38401	HSA-MIR-548D-3P	0,23	
38412	HSA-MIR-562	0,11	0,06
38413	HSA-MIR-563	0,21	0,12
38418	HSA-MIR-569	0,34	0,14
38424	HSA-MIR-578	0,26	0,16
38425	HSA-MIR-580	0,47	0,19
38434	HSA-MIR-591	0,29	0,19
38444	HSA-MIR-603	0,47	
38450	HSA-MIR-609	0,30	
38458	HSA-MIR-618		0,32
38470	HSA-MIR-632	0,39	0,25
38479	HSA-MIR-642A		0,20
38495	HSA-MIR-9	0,53	0,24

38496	HSA-MIR-95		0,30
38497	HSA-MIR-98	0,50	0,19
38541	HSA-MIR-542-3P	0,18	0,10
38553	HSA-MIR-335	0,09	0,08
38555	HSA-MIR-338-3P	0,10	0,06
38567	HSA-MIR-499-5P		0,40
38569	HSA-MIR-29B	0,14	0,11
38571	HSA-MIR-328	0,63	
38611	HSA-MIR-548C-5P	0,29	0,16
38625	HSA-MIR-582-5P	0,16	0,10
38626	HSA-MIR-590-5P	0,43	0,23
38630	HSA-MIR-624	0,31	0,27
38641	HSA-MIR-655	0,58	
38644	HSA-MIR-7	0,15	0,07
38659	KSHV-MIR-K12-3*	0,23	0,21
38973	HSA-MIR-22*	0,12	0,08
39111	EBV-MIR-BART19-3P	0,10	0,05
39129	EBV-MIR-BART8-5P	0,10	0,06
39133	EBV-MIR-BHRF1-2	0,19	0,15
39141	HCMV-MIR-UL22A*	0,18	0,09
39144	HCMV-MIR-UL70-5P	0,51	
39158	HSA-MIR-1	0,64	
39186	HSA-MIR-574-3P	0,34	
39204	HSA-MIR-208B		0,28
39240	HSA-MIR-182*	0,16	0,14
39262	HSA-MIR-196B		0,22
39300	HSA-MIR-29C	0,41	0,16
39304	HSA-MIR-302B*	0,14	0,07
39311	HSA-MIR-32	0,63	
39323	HSA-MIR-337-3P		0,25
39331	HSA-MIR-340		0,26
39354	HSA-MIR-384-5P	0,42	
39368	HSA-MIR-450A	0,64	
39370	HSA-MIR-451	0,08	0,06
39379	HSA-MIR-892A	0,22	0,16
39384	HSA-MIR-488	0,34	0,44
39390	HSA-MIR-491-3P	0,21	0,12
39419	HSA-MIR-514	0,10	0,11
39439	HSA-MIR-518D-3P	0,29	0,42
39440	HSA-MIR-518E	0,54	
39446	HSA-MIR-519A	0,09	0,07
39448	HSA-MIR-519B-3P	0,14	0,12
39455	HSA-MIR-519E	0,20	0,14
39456	HSA-MIR-520C-3P		0,24

39464	HSA-MIR-520E	0,12	0,10
39467	HSA-MIR-520H	0,42	0,27
39468	HSA-MIR-522	0,09	0,05
39859	EBV-MIR-BART1-3P	0,54	
39880	HSA-MIR-759	0,24	0,19
39889	HSA-MIR-454*	0,08	0,05
39945	HSA-MIR-129*		0,45
40044	HSA-MIR-194*		1,26
40052	HSA-MIR-26A-1*	1,00	1,30
40073	HSA-LET-7E*	2,16	3,61
40076	HSA-MIR-452*		0,12
40084	HSA-MIR-30C-2*	0,21	0,26
40222	HSA-MIR-1228*	1,02	2,00
40230	HSA-MIR-513B	0,23	0,11
40321	HSA-MIR-1246		1,08
40322	HSA-MIR-1247		1,34
40336	HSA-MIR-1260	1,30	1,90
40338	HSA-MIR-1262		1,25
40352	HSA-MIR-1275	2,57	6,31
40353	HSA-MIR-1276	12,53	19,25
40354	HSA-MIR-1277	0,94	
40359	HSA-MIR-1282	47,44	61,39
40371	HSA-MIR-1294	0,65	
40388	HSA-MIR-1322	8,28	8,63
40394	HSA-MIR-302E	211,90	182,28
40404	HSA-MIR-548E	0,02	0,02
40405	HSA-MIR-548F; HSA-MIR-548G	0,02	0,03
40431	HSA-MIR-1471	1,87	2,99
40437	HSA-MIR-1909	1,77	1,64
40469	HSV1-MIR-H4	1,05	
40483	HSA-MIR-1976	338,25	491,46
40487	HSA-MIR-205*		1,10
40488	HSA-MIR-2052	10,53	43,39
41432	HSA-MIR-764	0,22	0,23
41433	HSV1-MIR-H7	0,14	0,21

MicroRNAs	induziert in beiden MicroArrays
MicroRNAs	induziert in einem der MicroArrays

8. Thesen

1. Das basale MicroRNA-Expressionsprofil in den HAoECs ist gewebsspezifisch und besteht aus den MicroRNAs: MIR-22; der MIR-23a; der MIR-24; der MIR-27a; der MIR-31; der MIR-125b; der MIR-126-3p; der MIR-221; der MIR-222; der MIR-638; der MIR-663; der MIR-720 und der LET-7a.
2. MicroRNA-MicroArray-Analysen dienen als Screeningmethode, mit der aus ca. 1000 nachweisbaren MicroRNAs 11 Vertreter herausgefiltert werden konnten, die durch den MR bzw. GR reguliert sind. 5 Vertreter wurden weiter untersucht (MIR-21; MIR-23b; MIR-449c-3p; MIR-1908; MIR-2278) sowie zusätzlich die MIR-29b.
3. Für die Validierung der MicroArray-Analysen ist die RT-PCR eine bewährte Methode, hierbei zeigte die TaqMan-Methode im Vergleich mit der SybrGreen-Methode spezifischere Ergebnisse.
4. Für die MIR-21; MIR-23b; MIR-449c-3p; MIR-1908 und MIR-29b konnte keine MR- bzw. GR-induzierte Regulation mittels Validierung durch die RT-PCR nachgewiesen werden.
5. Für die MIR-2278 konnte die MR-induzierte Regulation in der RT-PCR mit dem TaqMan-System reproduziert werden.
6. In Luciferase-Reportergenanalysen mit einem Reportergenkonstrukt, welches eine Bindungsstelle der MIR-2278 enthält, konnte die MR-induzierte Regulation der MIR-2278 verifiziert werden.
7. Die Regulationspunkte des MR/GR in der MicroRNA-Expression könnten auf Ebene der Transkription oder auf Ebene der MicroRNA-Prozessierung durch Beeinflussung des Drosha und Dicer-Enzyms bzw. des MicroRNA-Exports stattfinden.
8. Der GR ist eng verwandt mit dem MR und weist viele Sequenzhomologien aus. Die funktionelle Wirkung beider Rezeptoren ist sehr unterschiedlich, wie die MR/GR-Spezifität reguliert wird, ist zum größten Teil unklar. Die bioinformatische Analyse in MicroRNA-Datenbanken zeigt den GR als Zielsequenz für die MIR-2278, dadurch könnte durch Inhibierung der GR-mRNA die MR-induzierte vermehrte Expression der MIR-2278 einen Erklärungsansatz für die MR-Spezifität gegenüber dem GR darstellen.
9. Bioinformatische Analysen mit der Datenbank MiRanda und MIRDB wurden zur Suche möglicher Zielsequenzen eingesetzt und zeigen die MR-mRNA als Zielsequenz der MIR-2278 auf, daher ist eine MR-Regulation im Sinne einer negativen Rückkopplung denkbar.
10. Bioinformatische Analysen zeigen weiterhin inflammatorische Gene als Zielstruktur der MIR-2278 auf, die eine Rolle in der MR-bedingten Pathophysiologie im

renokardiovaskulären System spielen. Die MIR-2278 könnte daher eine protektive Rolle spielen.

11. Der EGFR ist an den pathophysiologischen Vorgängen des MR beteiligt. Bioinformatisch wird GRB7 als weiteres Target der MIR-2278 vorhergesagt. GRB7 ist ein EGFR-interagierendes Protein. Damit kann die MIR-2278 der MR-Pathophysiologie entgegenwirken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Franziska Neid
Geburtsdatum: 08.11.1988
Geburtsort: Naumburg
Anschrift: Emil-Abderhalden-Straße 47, 06108 Halle
Email: franziska.neid@uk-halle.de

Ausbildung:

Seit 01/14 Facharztweiterbildung im Fach Orthopädie/Unfallchirurgie im
Department für Orthopädie, Unfall-und Wiederherstellungschirurgie
des Universitätsklinikums Halle
11/13 erfolgreicher Abschluss der 2. Ärztlichen Prüfung
09/09 erfolgreicher Abschluss der 1. Ärztlichen Prüfung
seit 10/07 Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
2007 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Famulaturen:

Handchirurgie: Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau (2011)
Unfallchirurgie: Universitätsklinikum Halle (2011)
Thoraxchirurgie: Südharzkrankenhaus Nordhausen (2011)
Dermatologie: Südharzkrankenhaus Nordhausen (2011)
Innere Medizin: KIM II (Nephrologie/Rheumatologie) Universitätsklinikum Halle
(2010)
Allgemeinmedizin: Praxis für Allgemeinmedizin, Laucha (2010)

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Dissertationsversuche

Hiermit erkläre ich, dass nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens von mir eingereicht wurde und auch keine anderen Promotionsversuche zu einem früheren Zeitpunkt an dieser oder einer anderen Universität erfolgt sind.

Halle, den 16.01.2016

Franziska Neid

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle möchte ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die stets freundliche Unterstützung und wertvollen Ratschläge während der gesamten Erstellung der Dissertation danken. Des Weiteren gilt ein großer Dank meiner Betreuerin Frau Junior-Prof. Dr. Claudia Großmann. Jederzeit gewährte sie mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Hilfe.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen sowie Mitdoktoranden des Julius-Bernstein-Institutes für die außerordentlich gute Zusammenarbeit bedanken. Diese Arbeit wäre ohne Ihre Hilfe und Geduld nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben:

Ein ganz besonderer Dank gilt meine Familie, die mir das Studium der Medizin ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immer unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die mich insbesondere in der Endphase der Erstellung dieser Arbeit ermutigt und motiviert haben und die mir bei dem ein oder anderen Problem mit Rat und Tat zur Seite standen.

