

Identifizierung und Charakterisierung eines Hormon-responsiven DNA-Elements des Mineralokortikoidrezeptors

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Sandra Meinel

geb. am 25.08.1982 in Wolfen

eingereicht am: 21.11.2014

verteidigt am: 24.03.2015

Gutacher:

1. Prof. Dr. Karin Breunig
2. Jun.-Prof. Dr. Dr. Claudia Großmann
3. PD Dr. Kristina Kusche-Vihrog

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1. Der Mineralokortikoidrezeptor (MR)	6
1.1.1. Molekulare Grundlagen: Aufbau und Struktur des MR.....	6
1.1.2. Koaktivatoren und Korepressoren des MR	9
1.1.3. Selektivität des Mineralokortikoidrezeptors.....	10
1.1.4. Aldosteron und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	11
1.2. Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR).....	14
1.2.1. Molekulare Grundlagen: Aufbau und Struktur des EGFR.....	14
1.2.2. EGFR-Aktivierung	16
1.2.3. Liganden der EGFR-Proteinfamilie und Induktion der Rezeptordimerisierung.....	17
1.2.4. EGFR-Signalkaskaden	19
1.3. Zusammenwirken von MR und EGFR	21
1.3.1. Physiologische Relevanz der MR-EGFR-Interaktion	21
1.3.2. Pathophysiologische Bedeutung der MR-EGFR-Interaktion	22
1.4. Zielsetzung der Arbeit	26
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1. Zellkultur	28
2.1.1. Zelllinien	28
2.1.2. Transiente Transfektionen	28
2.2. EGFR- <i>Knock-out</i> - und Wildtyp- Mäuse.....	30
2.3. Molekularbiologische Methoden	31
2.3.1. Isolierung von RNA.....	31
2.3.2. Quantifizierung von RNA.....	31
2.3.3. Reverse Transkription und Realtime-PCR	31
2.3.4. Isolation von DNA.....	33
2.3.5. Ethanol-Fällung (DNA).....	34
2.3.6. Isolierung von Plasmiden	34
2.3.7. Oligohybridisierung.....	34
2.3.8. DNA-Gelelektrophorese	35
2.3.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	36
2.3.10. Quantifizierung von DNA	37
2.3.11. Klonierung.....	37
2.4. Proteinbiochemische Methoden.....	40
2.4.1. Isolation von Proteinen	40

2.4.2. Isolation nukleärer Proteine.....	41
2.4.4. Western Blot	42
2.4.5. Fluoreszenzmikroskopie.....	43
2.5. Methoden zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen	44
2.5.1. Electromobility Shift Assay (EMSA)	44
2.5.2. Transkriptionsfaktor-ELISA.....	44
2.6. Bioinformatik	45
2.7. Statistik.....	46
3. ERGEBNISSE	47
3.1. Charakterisierung der Interaktion zwischen MR und EGFR-Promotor.....	47
3.1.1. Identifizierung des Mineralokortikoid-responsiven Elements des EGFR-Promotors	47
3.1.2. Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 für die MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors	49
3.1.3. Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP3 für die MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung des EGFR-Promotors	61
3.2. Pathophysiologische Relevanz der SP1-Hemmung für die EGFR-Expression in HAoSMC und A7r5-Zellen.....	64
3.3. Einfluss der MR-Aktivierung auf die Lokalisierung von EGFP-SP1 in HEK293-Zellen.....	66
3.4. Genomweite Suche und Identifizierung weiterer Mineralokortikoid-responsiver Elemente (MREs).....	68
3.4.1. Genomweite Suche nach Promotorregionen, die MRE1.3 ähneln.....	68
3.4.2. Validierung der vorhergesagten Promotoren putativer MR-regulierter Gene	70
3.5. Untersuchung der Korrelation zweier Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) des EGFR-Promotors mit dem Auftreten renokardiovaskulärer Erkrankungen.....	71
3.5.1. Charakterisierung der MRE1.3-SNPs.....	71
3.5.2. Korrelation der verschiedenen <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs) des EGFR-Promotors mit dem Auftreten renokardiovaskulärer Erkrankungen.....	78
RT ² Profiler PCR Arrays von murinen Ionenkanälen:.....	79
Validierung der putativen Ionenkanäle mittels RT-qPCR:.....	82
Untersuchungen zur Aldosteron-Abhängigkeit der Veränderungen der Ionen-kanalexpression:.....	85
4. DISKUSSION	87
4.1. Charakterisierung der Interaktion zwischen MR und EGFR-Promotor.....	87
4.1.1. SP1 als Kofaktor der MR/Aldosteron-induzierten EGFR-Promotoraktivierung.....	87
4.1.2. Die Rolle des Transkriptionsfaktors SP3 für den Mechanismus der Aldosteron-abhängigen EGFR-Promotoraktivierung	92
4.2. Pathophysiologische Relevanz des Transkriptionsfaktors SP1 für MR-vermittelte Signalwege.....	94
4.3. Lokalisierung von EGFP-SP1 und RFP-MR in HEK293-Zellen	95

4.4. Identifikation weiterer Mineralokortikoid-responsiver Elemente	96
4.5. Korrelation zweier <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs) des EGFR-Promotors mit dem Auftreten renokardiovaskulärer Erkrankungen	97
4.5.1. Bindung an SP1 sowie MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung der MRE-SNPs.....	97
4.5.2. Korrelation der SNPs mit kardiovaskulären Erkrankungen	100
4.5.3. Expressionsveränderungen von Ionenkanälen, die zum Vorhofflimmern beitragen können	104
5. ZUSAMMENFASSUNG	112
6. LITERATURVERZEICHNIS	114
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	130
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	136
9. ANHANG	137
10. DANKSAGUNGEN	163
11. LEBENS LAUF	165
12. PUBLIKATIONEN	167
13. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	169

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, vor allem in der Bevölkerung von Industrie- und Schwellenländern, gelten sowohl weltweit als auch in Europa als häufigste Todesursache. So sterben laut Weltgesundheitsorganisation WHO pro Jahr auf der Erde ca. 17 Millionen Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, hauptsächlich an Schlaganfall und Herzversagen. Allein in Europa sterben dabei jährlich etwa 4 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Krankheiten. Im Vergleich dazu verlieren pro Jahr insgesamt ca. 8,2 Millionen Menschen und davon ungefähr 1,7 Millionen Europäer ihr Leben auf Grund verschiedener Krebserkrankungen, welche die zweithäufigste Todesursache darstellen (Stand 2012). Während der Anteil der Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Europa unter allen Todesursachen im Jahr 2002 bei ca. 22% lag, stieg der Anteil auf etwa 47% im Jahr 2012 [1,2]. Zu den entscheidenden kardiovaskulären Risikofaktoren gehören neben dem Alter, erhöhter Bluthochdruck, Übergewicht (Adipositas), Diabetes, ein erhöhter Cholesterinspiegel, aber auch Tabak- und Alkoholkonsum [3]. Auf Grund der hohen Sterblichkeitsrate und der Vielseitigkeit der Ursachen von kardiovaskulären Erkrankungen, besteht ein großes Interesse an der Aufklärung der molekularen Mechanismen und Signalkaskaden, die eine Entstehung begünstigen, um neue Therapieansätze und Medikamente entwickeln zu können. Mit dem Mineralokortikoidrezeptor (MR) konnte ein wichtiger Regulator der Natriumchlorid- sowie Wasserhomöostase identifiziert werden, der daraus resultierend entscheidenden Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks ausübt. Unabhängig davon spielt der MR eine bedeutende Rolle hinsichtlich pathologischer Gewebsveränderungen des renokardiovaskulären Systems. So führen die MR-induzierten pathophysiologischen Wirkungen zu Remodelingprozessen in den Herzgefäßen sowie zur Hypertrophie und Fibrose der Vorhöfe (Atrien) und Herzkammern (Ventrikel) sowie zu Nierenerkrankungen mit Nephrosklerose und vaskulären Dysfunktionen [4–6]. In drei klinischen Studien konnte die pathophysiologische Bedeutung des MR eindrucksvoll nachgewiesen werden. Die Studien RALES (**R**andomized **A**ldactone **E**valuation **S**tudy), EPHEsus (**E**plerenone **H**eart **F**ailure **E**fficacy and **S**urvival **S**tudy) und EMPHASIS-HF (**E**plerenone in **M**ild **P**atients **H**ospitalization and **S**urvival **S**tudy in **H**eart **F**ailure) zeigen, dass die Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz oder Patienten nach Myokardinfarkt mit MR-Antagonisten eine 15%ige bzw. 30%ige Reduktion der Mortalität und Morbidität bewirkt [7–9]. Neben dem MR wurde außerdem der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) als Vermittler pathophysiologischer Veränderungen des renokardiovaskulären Systems identifiziert. So kann dieser neben einer klassischen Aktivierung durch Liganden auch über G-Proteingekoppelte Rezeptoren von vasoaktiven Substanzen wie Endothelin I und Angiotensin II transaktiviert werden. Eine gesteigerte Expression des EGFR würde somit potenziell auch die Wirkung dieser Signalkaskaden verstärken. In der Vergangenheit erfolgte der Nachweis

der Interaktion zwischen MR und der EGFR-Kaskade bereits in der Aorta, in Koronargefäßen und Gehirnschnitten von Ratten. Im Rahmen dieser Arbeiten führte die Gabe von Mineralokortikoiden zu Gefäßkontraktionen, -fibrose und -remodeling bei gleichzeitiger Steigerung der EGFR-Expression [10–12]. Das Zusammenwirken des MR mit dem EGFR führt somit zu einer Vielzahl an physiologischen, aber auch pathophysiologischen Effekten, die in der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bedeutend sind. Eine Charakterisierung der Rezeptoren sowie des Zusammenspiels beider Faktoren soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.1. Der Mineralokortikoidrezeptor (MR)

Der Mineralokortikoidrezeptor wird hauptsächlich in verschiedenen epithelialen Geweben exprimiert. Hierzu gehören die Nieren, der Darm sowie Speichel- und Schweißdrüsen. Weiterhin konnte die Expression des Rezeptors in Kardiomyozyten, Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, aber auch im Hippocampus des Nervensystems nachgewiesen werden [13–15]. In epithelialen Geweben ist der MR hauptsächlich an der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts beteiligt. So führt die Aktivierung des Rezeptors zur vermehrten Expression von Ionenkanälen, wie dem Amilorid-sensitiven Natriumkanal ENaC, oder Ionttransportern, wie der Natrium-Kalium-ATPase, welche die Rückresorption von Natriumionen und Wasser bei gleichzeitiger, vermehrter Kaliumausscheidung bewirken [16]. In nicht-epithelialen Geweben kann der MR verschiedene pathophysiologische Effekte in Form von Fibrose (krankhaftes Ausbreiten von Bindegewebe), Inflammation (Entzündung), Remodeling (struktureller Umbau des Gewebes) sowie Hypertrophie (Vergrößerung des Gewebes/Organs durch Zunahme des Zellvolumens bei gleichbleibender Zellzahl) vermitteln [10,17–19].

1.1.1. Molekulare Grundlagen: Aufbau und Struktur des MR

Das Gen, welches für den Mineralokortikoidrezeptor (MR) kodiert, ist beim Menschen in der Region q31.1 auf dem Chromosom 4 lokalisiert [20]. Es besteht aus insgesamt 10 Exons, von denen die ersten beiden, 1 α und 1 β , nicht translatiert werden [20,21]. Hierbei fungieren die zwei nicht-translatierten Exons als Promotoren, welche die Expression zweier verschiedener Isoformen der MR-mRNA bewirken [21]. So wird die unter dem starken proximalen 1 α -Promotor gebildete Isoform in Aldosteron-beeinflussten Geweben wie Niere, Herz, Kolon, Gehirn, Lunge, Leber, Fettgewebe und Reproduktionsorganen exprimiert. Im Gegensatz dazu spielt die unter dem schwachen distalen 1 β -Promotor exprimierte Isoform nur in bestimmten Entwicklungsphasen oder unter spezifischen physiologischen Bedingungen eine Rolle [22,23].

Funktionell gehört der MR zur Familie der Steroidhormonrezeptoren, speziell zur Superfamilie III der Nukleären Rezeptoren, zu der auch der Glukokortikoid- (GR), Östrogen- (ER), Progesteron- (PR) und der Androgenrezeptor (AR) gehören [24,25]. Diese Steroidrezeptoren sind Liganden-gesteuerte Transkriptionsfaktoren, die an Hormon-responsive Elemente (HREs) der DNA binden und so gezielt eine Veränderung der mRNA- und ggf. Proteinsynthese auf genomischer Ebene bewirken [24]. Charakteristisch für die Mitglieder dieser Familie von Rezeptoren sind die vier funktionellen Domänen, die am Beispiel des MR dargestellt werden (Abb. 1). Die Aktivierungsfunktion (AF-1) wird durch die N-terminale A/B-Domäne vermittelt, welche unabhängig vom Liganden wirkt. Aktivierungsdomänen weisen im Gegensatz zu DNA-Bindedomänen keine definierten Strukturen auf und sind innerhalb der Steroidrezeptoren wenig konserviert sowie in Länge und Sequenz sehr variabel. Die Aktivierung erfolgt über die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und/oder anderen Kofaktoren. Die C-Domäne, welche zwei Zinkfinger-Motive beinhaltet, vermittelt die DNA-Bindung. Es folgen eine Scharnierregion (Domäne D) und die für die Ligandenbindung und Dimerisierung verantwortliche E/F-Domäne, welche außerdem an Hitzeschockproteine, wie z.B. HSP90, binden kann.

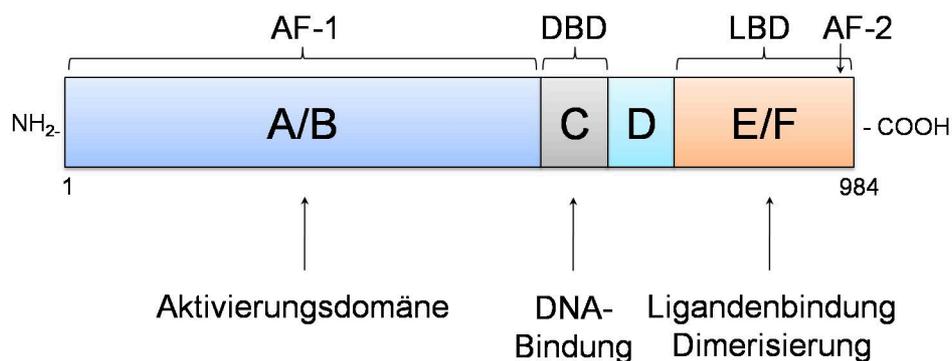


Abb. 1: Charakteristische Protein-Domänen von Nukleären Rezeptoren am Beispiel des MR. Dargestellt werden die Aktivierungsdomäne (A/B), die DNA-Bindedomäne (C), die Scharnierregion (D) sowie die Ligandenbindungsdomäne (E/F) klassischer Nukleärer Rezeptoren.

Die durch Exon 2 kodierte N-terminale A/B-Domäne des MR besteht aus 602 Aminosäuren und besitzt damit die längste N-terminale Domäne unter allen Steroidrezeptoren. Diese enthält neben den zwei Transaktivierungsdomänen, AF-1a (1-167aa) und AF-1b (445-602aa) sowie einer dazwischen liegenden inhibitorischen Domäne, die Serin-Threonin-reiche Kernlokalisierungssequenz (NLS0) an Position 590-602 der Aminosäuresequenz [26,27]. AF-1 moduliert die Transkription unabhängig vom Hormon, wenn der MR im Nukleus lokalisiert vorliegt, und unterscheidet sich damit von der C-terminalen AF-2-Transaktivierungsdomäne, die in ihrer Funktion eine Abhängigkeit vom Liganden zeigt [24]. Da die N-terminale Region am stärksten zwischen den Steroidhormonrezeptoren, insbesondere zwischen MR und

Glukokortikoidrezeptor (GR), variiert, wird diese als entscheidend für die Spezifität des Mineralokortikoidrezeptors betrachtet [27,28]. Die von Exon 3 und 4 kodierte DNA-Bindedomäne (DBD) umfasst 66 Aminosäuren und besteht aus zwei Zinkfingermotiven, die für die Bindung an Hormon-responsive Elemente (HREs) verantwortlich sind. Sie ist mit einer Homologie von 90% von allen Domänen am stärksten zwischen den Mitgliedern der Steroidhormonrezeptor-Familie konserviert [29]. Die Homologie der Aminosäuresequenz der C-Domäne beträgt zwischen MR und GR sogar 94 %. So teilen beide Rezeptoren auch ein gemeinsames Hormon-responsives Element, das Glukokortikoid-responsive Element (GRE), an das beide binden können [30]. Da beide Rezeptoren dennoch unterschiedliche Funktionen haben, liegt die Vermutung nahe, dass spezifische Mineralokortikoid-responsive Elemente (MREs) existieren, die kein klassisches GRE-Element enthalten. Neben der DNA-Bindfunktion konnte ebenfalls eine schwache Dimerisierungsfunktion innerhalb der C-Domäne der Steroidhormonrezeptoren, sowie ein Kernexportsignal zwischen den beiden Zinkfingermotiven nachgewiesen werden [31–33]. Die Prolin-reiche, als Scharnierregion identifizierte D-Domäne umfasst die Region 671-732 der Aminosäuresequenz und ist sehr schwach konserviert. Sie ermöglicht eine relative Richtungsänderung von DNA-Bindedomäne und Liganden-Bindedomäne zueinander, welches die Aktivierung des Rezeptors bewirkt. Außerdem besitzt sie eine schwache Kernlokalisierungssequenz (NLS1) [27]. Sowohl für den GR als auch den Progesteronrezeptor (PR) wurde ein Sequenzbereich in der Region 505-656 (GR) bzw. 634-933 (PR) innerhalb der Scharnierregion des GR bzw. der Scharnierregion sowie LBD des PR beschrieben, der an Dimerisierungsprozessen beteiligt ist [34,35]. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD, E/F) besteht aus 251 Aminosäuren und zeigt eine 55%-ige Homologie zu den anderen Steroidhormonrezeptoren. Es handelt sich um eine komplexe, multifunktionale Domäne, deren Struktur mittels Kristallisation sowohl für den Androgen- [36], Östrogen- [37], Progesteron- [38], Glukokortikoid- [39] als auch den Mineralokortikoidrezeptor [40,41] bestimmt werden konnte. Die E/F-Domäne besteht aus 12 α -Helices, die anti-parallel in 3 Schichten zu einer β -Faltblattstruktur angeordnet sind [29]. Für die Ligandenbindung entscheidend sind die Helices 3, 4, 5 und 12. So bilden in Abwesenheit von Liganden, ein Glutamatrest in Helix 12 und ein Lysinrest in Helix 3 zusammen mit einer aus Helix 3, 4 und 5 bestehenden hydrophoben Tasche die Aktivierungsfunktion AF-2, welche für die Protein-Protein-Interaktionen entscheidend ist [29]. Die Bindung eines Liganden führt dann zu einer strukturellen Verdichtung der Helices und dadurch zur Änderung der Position von Helix 12, was deren Interaktion mit den Helices 3, 5 und 11 ermöglicht. Diese Interaktion führt zur Ausbildung eines hydrophoben Spalts (AF-2) an der Oberfläche der E/F-Domäne, welche in der Lage ist, an Koaktivatoren mit LxxLL-Motiv zu binden [39,41]. Es ist außerdem bekannt, dass die LBD in Abwesenheit von Liganden an verschiedene Chaperone, wie die Hitzeschockproteine HSP70 oder HSP90, an

Kochaperone wie p23, p48 oder Immunophiline wie z.B. Cyclophilin 40 bindet [42–45]. Nach Bindung der Liganden dissoziieren diese Chaperone von der LBD und geben so das Kernlokalisierungssignal (NLS2) frei, welches für die Translokation in den Nukleus verantwortlich ist [26,46].

1.1.2. Koaktivatoren und Korepressoren des MR

Die transkriptionelle Aktivität von nukleären Rezeptoren beruht auf der Bindung von Koaktivatoren oder der Dislokation von Korepressoren [29,47]. Der MR besitzt zwei Regionen, die mit Koaktivatoren interagieren können, AF-1 in der N-terminalen A/B-Domäne und AF-2 in der Ligandenbindungsdomäne E/F. Hierbei ist der relative Beitrag dieser Regionen zur Aktivierungsfunktion abhängig von Zelltyp und Promotor-spezifischem Kontext [48]. So werden die Gewebe-spezifischen Cortisol/Corticosteron-Effekte auf den MR, der Interaktion mit verschiedenen Koregulatoren zugeschrieben [29]. Eine Vielzahl verschiedener Koregulatoren, die sowohl mit nukleären Rezeptoren als auch anderen Transkriptionsfaktoren interagieren, konnte identifiziert werden [49]. Es lassen sich allgemeine Koregulatoren von solchen abgrenzen, denen eine gewisse MR-Spezifität zugeschrieben wird. Mitglieder der p160-Familie von Koaktivatoren, zu denen SRC-1 (**S**teroid **R**eceptor **C**oaktivator 1), SRC-2 und SRC-3 gehören, zählen zu der Gruppe der allgemeinen Koaktivatoren und können an den MR binden [47]. Hierbei erfolgt die Interaktion der SRC-Koaktivatoren hauptsächlich über AF-2 der E/F-Domäne [29,41,50]. Neben den allgemeinen spielen die MR-spezifischen Koregulatoren eine entscheidende Rolle. So wurde der Elongationsfaktor ELL (**E**leven-**N**ineteen **L**ysine-rich **L**eukemia) als hoch selektiver Koregulator des MR beschrieben, welcher direkt mit der N-terminalen AF-1b Region des MR interagiert [51]. ELL unterbindet außerdem die GR-Transaktivierung, zeigt aber keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des Androgen- oder Progesteronrezeptors. ELL verstärkt sowohl die Aldosteron- als auch die Cortisol-vermittelte Transaktivierung des MR [27,51]. Ein weiterer mit der AF-1a-Region interagierender Koaktivator-Komplex konnte aus HeLa-Zellen isoliert werden. Dieser Komplex besteht aus dem CREB-Bindeprotein (CBP) und der RNA-Helikase A (RHA) [52]. Untersuchungen bestätigen, dass der Komplex über RHA nur in Anwesenheit von Aldosteron, jedoch nicht in Anwesenheit von Cortisol, binden kann [52]. Die allgemeinen Korepressoren nukleärer Rezeptoren, NcoR (**N**uclear Receptor **C**orepressor) und SMRT (**S**ilencing **M**ediator of **R**etinoic Acid and **T**hyroid Hormone Receptor), binden konstitutiv an Hormon-responsive Elemente ihrer Zielpromotoren. Eine Regulation der transkriptionellen Aktivität des MR entsteht durch das Binden dieser Moleküle an die hydrophobe Spalte der freien Ligandenbindungsdomäne. Infolgedessen werden Histondeacetylasen rekrutiert und so die Genexpression gehemmt [27]. Eine Interaktion von Mitgliedern der PIAS-Proteinfamilie (**P**rotein Inhibitor of **A**ctivated **S**ignal Transducer and **A**ctivator of Transcription) mit den verschiedenen Steroidhormonrezeptoren wurde ebenfalls

beschrieben. Hierbei wurde mit PIAS1 ein MR-spezifischer Korepressor identifiziert, der an die N-terminale Domäne bindet. PIAS1 wirkt als Ubiquitin-verwandte SUMO-E3-Ligase und ist in der Lage, den MR *in vitro* und *in vivo* zu sumoylieren [53]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine Interaktion der A/B/C-Domänen mit dem SUMO-E2-aktivierenden Protein Ubc9 zur Potenzierung der Aldosteron-abhängigen Transaktivierung führt [54].

1.1.3. Selektivität des Mineralokortikoidrezeptors

Neben der hohen strukturellen und funktionellen Homologie zwischen MR und GR, teilen sich beide Rezeptoren die Eigenschaft, dass Glukokortikoide binden können. Die Glukokortikoide Cortisol oder Corticosteron binden mit einer ähnlichen Affinität wie Aldosteron an den MR. Obwohl Glukokortikoide im Vergleich zu Aldosteron in einer wesentlich höheren Plasmakonzentration (100-1000-fach) vorkommen und so hauptsächlich Cortisol an den MR binden sollte, ist die Bindung von Aldosteron an den MR in physiologischen Konzentrationen hochselektiv. Im Gegensatz dazu, bindet Aldosteron nur an den GR, wenn dieses in hohen nicht-physiologischen Konzentrationen vorliegt [29,48]. Die Spezifität der Aldosteron-Bindung des MR konnte der Aminosäuresequenz im Bereich 820-844 der LBD zugeordnet werden. So wurden 12 dieser 25 Aminosäuren als essentiell für die Aldosteron-Bindung bestätigt [55]. Dieselbe Region ist außerdem bedeutend für die Cortisol-induzierte Transaktivierung, jedoch nicht entscheidend für die Bindung [55]. Anhand der Kristallstruktur der E/F-Domäne (LBD) des MR ist anzunehmen, dass die Aminosäuren 820-844 keinen Teil der Liganden-bindenden hydrophoben Tasche bilden und die Aldosteron-Spezifität daher auf indirekten Interaktionen mit dem Steroid zurückzuführen ist [29].

Neben den strukturellen Grundlagen der Aldosteron-Selektivität des MR spielt das Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 β -HSD2) eine entscheidende Rolle. In Aldosteron-beeinflussten epithelialen Geweben, wie Niere, Darm und Speicheldrüsen wandelt dieses Enzym aktives Cortisol im Menschen bzw. Corticosteron in Nagern in inaktives Cortison und 11-Hydrocorticosteron um, welche nicht mehr vom MR gebunden werden können [56]. So kann der MR durch die gleichzeitige Expression der 11 β -HSD2 z.B. in der Niere selektiv und in Abhängigkeit der Konzentration wirken, da Aldosteron kein Substrat des Enzyms darstellt. Nicht-epitheliale Gewebe, z.B. im Hippocampus oder im Herzen, exprimieren kein 11 β -HSD2-Enzym, sodass der MR hier als Cortikosteroid-Rezeptor wirkt und es zu einer Daueraktivierung durch die Glukokortikoide kommt [57].

1.1.4. Aldosteron und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Der klassische epitheliale Ligand des Mineralokortikoidrezeptors ist das Steroidhormon Aldosteron, welches Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ist, und an der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts sowie des Blutdrucks mitwirkt [58,59]. Die Bildung erfolgt hauptsächlich in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde aus Cholesterin. Bevor Cholesterin in Aldosteron umgewandelt werden kann, muss es mittels StAR-Protein (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) von der äußeren in die innere Mitochondrienmembran transportiert werden, wo es durch verschiedene Enzyme, unter anderem die Aldosteronsynthase (CYP11B2), synthetisiert wird [60,61]. Die Aktivierung der Kaskade der Aldosteronsynthese erfolgt bei Natriummangel, Wasserverlust oder niedrigem Blutdruck und startet dabei mit dem Angiotensinogen, welches hauptsächlich in der Leber synthetisiert und anschließend in den Blutkreis abgegeben wird. Das Umwandeln des Angiotensinogens in Angiotensin I (Ang I) findet anschließend in den juxtaglomerulären Zellen der Nieren durch die Protease Renin statt. Im Folgenden wandelt das *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) das Angiotensin I in die biologisch aktive Form des Angiotensin II (Ang II) um, welches dann zusammen mit erhöhten Plasma-Kaliumkonzentrationen und dem Adenocorticotropen Hormon (ACTH) die Synthese des Aldosteron stimuliert (Abb. 2). Außerhalb der Nebennierenrinde konnte außerdem sowohl im Gehirn als auch im vaskulären Gewebe und im Herzmuskel eine extra-renale Aldosteronsynthese nachgewiesen werden [62–64]. Es ist außerdem bekannt, dass neben dem klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, ausgehend von den juxtaglomerulären Zellen, verschiedene lokale RAAS existieren, die oft klinische Relevanz besitzen [65–67]. Der Nachweis solcher lokaler RAAS erfolgte in einer Vielzahl von Geweben, so z.B. in Pankreas [68,69], Herz [70], Nieren [66], Gefäßen [71,72], adipösem Gewebe [73] sowie dem Nervensystem [74,75], den Reproduktionsorganen [76] und im Verdauungstrakt [77–79]. Lokale Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systeme agieren autokrin, parakrin und/oder intrakrin und entfalten so diverse Funktionen, wie z.B. die Regulation der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, des Zellwachstums, der Differenzierung, Proliferation sowie der Apoptose, Entzündung und Fibrose von Geweben [79].

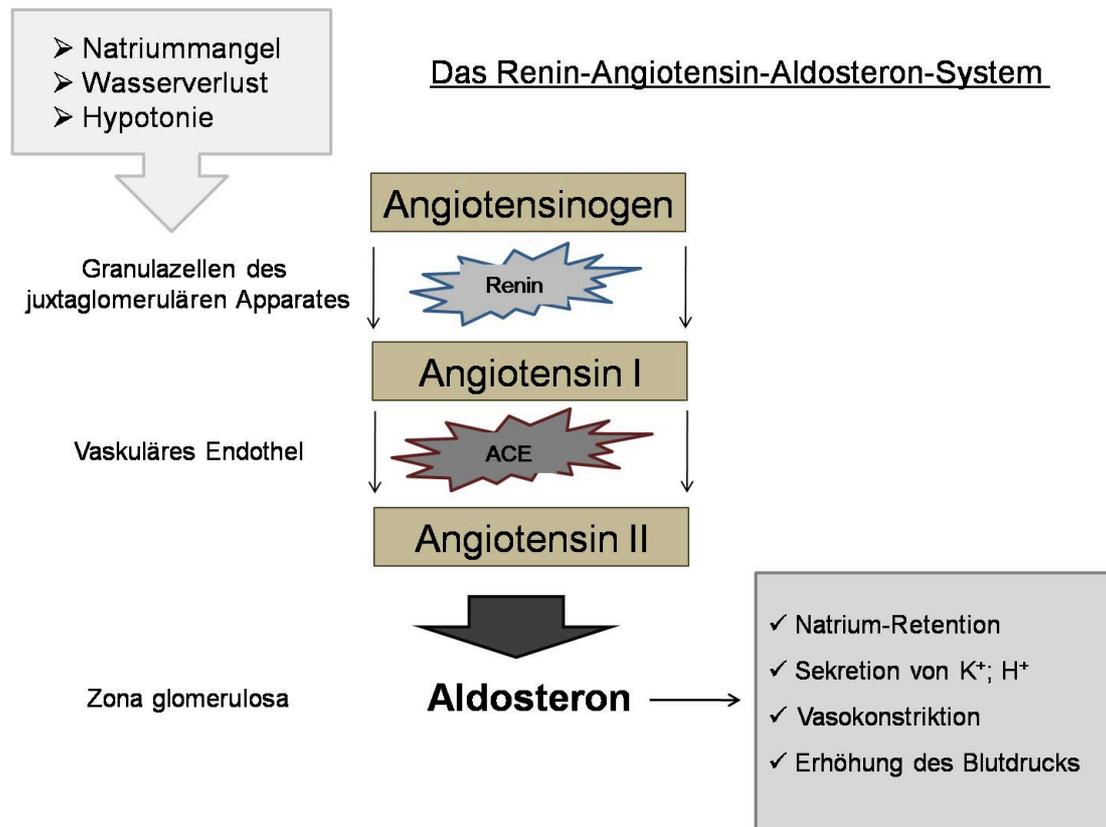


Abb. 2: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.

1.1.4.1. MR/Aldosteron in nicht-epithelialen Geweben

In nicht-epithelialen Geweben des kardiovaskulären Systems sowie des Zentralnervensystems konnte der MR ebenfalls nachgewiesen werden [14,80]. So ist er im ZNS an der Blutdruck-Regulation, NaCl-Homöostase und Regulation des Sympathikotonus beteiligt, wohingegen er innerhalb des Herz-Kreislauf-Systems eine entscheidende Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen spielt [81]. Im Folgenden sollen die Aldosteron-Effekte auf das kardiovaskuläre System im Vordergrund stehen.

Die chronische Gabe von Aldosteron im Tiermodell verursacht eine interstitielle Fibrose und Hypertrophie des Herzens, welche unabhängig vom Blutdruck ausgeprägt sind [82,83]. In Patientenstudien wurde weiterhin gezeigt, dass Hyperaldosteronismus häufiger zur Hypertrophie der linken Herzkammer und dem Auftreten von Schlaganfällen führt als in Vergleichsgruppen mit normalem Aldosteronspiegel [84–86]. Gleichzeitig konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit den MR-Antagonisten Spironolakton und Eplerenon in Patienten mit Herzinsuffizienz zu einer Senkung der Mortalitätsrate sowie Morbiditätsrate führt [7,8,87]. Inzwischen werden

Eplerenon und Spironolaktone standardmäßig als Bestandteil der Therapie von Herzinsuffizienz verwendet. Die Behandlung mit Eplerenon bewirkte in Ratten weiterhin eine Reduktion und sogar teilweise Rückbildung der MR-induzierten Fibrose [88]. Die Mechanismen der pathophysiologischen Wirkungen von Aldosteron gehen oft mit einer Proliferation von kardialen Fibroblasten einher und führen so zu einer Fibrose des Herzens. In verschiedenen Tiermodellen konnte eine Steigerung der Expression verschiedener Entzündungsmarker, wie z.B. TNF α , sowie eine Erhöhung der Synthese von Kollagen I und III beobachtet werden [89,90]. Andere Veröffentlichungen gehen davon aus, dass Schädigungen des Herzens primär durch Entzündungen der versorgenden Gefäße entstehen und hierbei oxidativer Stress eine entscheidende Rolle spielt [91–93]. In transgenen Mäusen mit 11 β -HSD2-Überexpression zeichnet sich bei normaler Salzdiät eine gesteigerte Aktivierung des MR mit gleichzeitiger Hypertrophie, Fibrose und anschließendem Herzversagen ab [94]. Mausherzen, in denen der MR überexprimiert wird, zeigen zudem eine Erweiterung des Herzmuskels [95]. Weiterhin wurden in der Vergangenheit gefäßverengende Aldosteron-Wirkungen in glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben [96,97]. Die Aufklärung der genauen Mechanismen der pathophysiologischen Aldosteron-MR-Wirkung ist von großem Interesse für die Therapiestrategien von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und erfordert weitere Untersuchungen.

1.1.4.2. Nicht-genotrope Wirkungen von MR/Aldosteron

Nicht-genotrope Wirkungen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Expression von Genen nicht direkt beeinflussen und innerhalb von Sekunden bzw. Minuten in der Zelle ablaufen können. Aufgrund dessen zeigt eine Inkubation mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D oder dem Translationshemmer Cycloheximid keinen Einfluss auf die nicht-genotropen Effekte [15,98]. Nicht-genotrope Aldosteron-Wirkungen konnten in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, so z.B. den Nieren, im Kolon, in Gefäßwänden oder im Herzen [15,99]. Der molekulare Mechanismus der schnellen Aldosteron-Effekte ist weitestgehend unbekannt, es wird jedoch vermutet, dass diese über Rezeptoren, *Second messenger* (z.B. NO) oder Effektoren vermittelt werden. In CHO-Zellen (**C**hinese **H**amster **O**vary) sowie einer humanen embryonalen Nierenzelllinie (HEK293) konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit Aldosteron zu schnellen Antworten der ERK1/2- und JNK1/2-Signalkaskaden führt, die durch Spironolaktone hemmbar waren. Im Gegensatz dazu induziert Aldosteron sowohl in MR-transfizierten als auch MR-untransfizierten Zellen einen schnellen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentrationen, welcher durch die Inkubation mit Spironolaktone nicht gehemmt wurde [100]. Man spricht somit von MR-abhängigen und MR-unabhängigen schnellen Aldosteron-Effekten. Diese schnellen MR-unabhängigen Aldosteron-Effekte wurden zuerst durch Wehling et al. beschrieben. So war in diesen Studien die schnelle Wirkung von Aldosteron auf den Natrium-Protonenaustauscher in mononukleären

Leukozyten und glatten Gefäßmuskelzellen nicht durch Aldosteron-Antagonisten hemmbar [101]. In neueren Veröffentlichungen werden die schnellen MR-unabhängigen Aldosteron-Effekte einem neuen Aldosteron-Rezeptor zugeordnet. Bei diesem Rezeptor handelt es sich um GPR30 (GPER: **G** Protein-Coupled **E**strogen **R**eceptor), welchen Gros et al. in glatten Gefäßmuskelzellen als Vermittler rapider Aldosteron-Wirkungen identifiziert haben [102]. In vaskulären Endothelzellen der Ratten-Aorten mit robuster GPR30- und kaum messbarer MR-Expression konnte gezeigt werden, dass Aldosteron zu einer Erhöhung der ERK-Phosphorylierung führt und so pro-apoptotische, proliferative und vasodilatatorische Effekte induziert, die durch GPR30-Antagonisten hemmbar waren [103]. In weiteren Untersuchungen wurde außerdem eine Aldosteron-induzierte Verlangsamung des Herzschlages beschrieben, die durch GPR30-Antagonisten, nicht jedoch durch Spironolaktone oder Eplerenon gehemmt wurde [104]. Da der Rezeptor GPR30 eine Vielzahl verschiedener Steroide binden kann, wird seine Rolle momentan kontrovers diskutiert und eine Aufklärung der grundlegenden Mechanismen bleibt abzuwarten. Trotz der neueren Berichte über die GPR30-vermittelten schnellen Aldosteron-Effekte, ist bekannt, dass der MR den Großteil der nicht-genotropen Wirkungen vermittelt. So beeinflusst der Mineralokortikoidrezeptor verschiedene Komponenten einer Vielzahl zytosolischer Signalkaskaden und reguliert z.B. die Calcium-Konzentration oder die Aktivität verschiedener Proteinkinasen, wie z.B. die der Proteinkinasen A, C und D (PKA, PKC und PKD). Weiterhin können verschiedene Membranproteine und Rezeptoren, wie z.B. NHE1, Kaliumkanäle, H⁺-ATPase oder ENaC, aktiviert oder moduliert werden. Die Interaktionen des Aldosteron-stimulierten MR mit anderen Signalkaskaden und Proteinen ermöglichen eine hochdynamische Feinregulation als Antwort auf verschiedene Bedingungen in den Zellen oder Geweben [99].

1.2. Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Beim EGFR handelt es sich um einen Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, der in allen Zelltypen und Geweben exprimiert wird. Der EGFR ist ein entscheidender Bestandteil verschiedener Signalkaskaden und zeigt sowohl physiologische als auch pathophysiologische Effekte. So spielt er eine Rolle in der fetalen Entwicklung, Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen sowie bei der Kontraktion von Gefäßen. Außerdem ist er ein bekanntes Ziel in der Krebstherapie [105,106].

1.2.1. Molekulare Grundlagen: Aufbau und Struktur des EGFR

Das Gen, welches für den EGFR kodiert, ist das sogenannte Protoonkogen c-erb1 [107,108], welches beim Menschen in der Region p12.3-p12.1 auf dem Chromosom 7 lokalisiert ist [109] und aus 28 Exons besteht [110]. Der 170 kDa große EGFR wird dabei durch zwei

Haupttranskripte (5,8 kb und 10,5 kb) gebildet [108]. Neben einer 5'-UTR enthält Exon 1 Sequenzen, die für ein Signalpeptid sowie die ersten 5 Aminosäuren des Rezeptors kodieren. Die Translation der Exons 2-16 bewirkt die Bildung der extrazellulären Domäne, wobei zwei Cystein-reiche Sequenzmotive aus den Exons 5-7 sowie 13-16 entstehen. Die kurze transmembrane Domäne wird aus Exon 17 translatiert. Die Tyrosinkinasedomäne und die carboxyterminale Region bilden den intrazellulären Teil des EGF-Rezeptors und werden durch die Exons 18-24 bzw. 25-28 gebildet [111].

Funktionell gehört der EGFR zu den Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), welche durch eine N-terminale extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne (LBD), eine Transmembranhelix und eine intrazelluläre C-terminale Domäne mit Tyrosinkinasefunktion gekennzeichnet sind. Eine Aktivierung dieser RTKs erfolgt entweder über die Bindung ihrer spezifischen Liganden oder durch Transaktivierung im Zusammenspiel mit anderen Signalkaskaden. Der EGFR, auch als ErbB1 bezeichnet, gehört zu einer Proteinfamilie, die außerdem ErbB2, ErbB3 und ErbB4 beinhaltet. Er besteht aus einer Polypeptidkette aus 1186 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 170 kDa. Die aus 622 Aminosäuren bestehende extrazelluläre Domäne enthält zwei Cystein-reiche Regionen, die für die Bindung der Liganden verantwortlich sind. Auf die α -helikale Transmembrandomäne (23 AS) folgt die intrazelluläre zytoplasmatische Domäne, bestehend aus 542 Aminosäuren (Abb. 3). Die extrazelluläre Domäne besteht aus 4 Untereinheiten (I-IV), von denen die Domänen I (AS 1-165) und III (AS 310-481), auch als L1 und L2 bezeichnet, eine hohe Homologie aufweisen [112]. Es ist bekannt, dass Untereinheit L2 für die Ligandenbindung, und L1 für die Liganden-induzierte Dimerisierung des Rezeptors verantwortlich ist [113,114]. An L1 und L2 schließt sich jeweils eine Cystein-reiche Untereinheit (II und IV), auch als S1 und S2 bezeichnet, an. Dabei befindet sich S1 in der Region 166-309 und S2 in der Region 482-621 der Aminosäuresequenz. Es konnte gezeigt werden, dass sie eine entscheidende Funktion in der Liganden-abhängigen Transaktivierung des Rezeptors haben [115]. Während S1 eine entscheidende Rolle bei der Dimerisierung mit anderen Rezeptoren hat [116], trägt S2 außerdem das Signal für die Lokalisierung des Rezeptors in der Membran [117]. Auf die nachfolgende einfache hydrophobe Transmembrandomäne folgt die intrazelluläre Domäne, bestehend aus der hochkonservierten Tyrosinkinasedomäne (AS 685-953) und der C-terminalen Region (AS 965-1186), welche über die drei Autophosphorylierungsstellen Y1068, Y1148 und Y1173 verfügt [116,118,119]. Weitere Phosphorylierungs- bzw. Aktivierungsstellen befinden sich an den Stellen Y952, Y1045 und Y1086, welche Ziele verschiedener Kinasen, wie z.B. ERK1/2, sind [116,120,121].

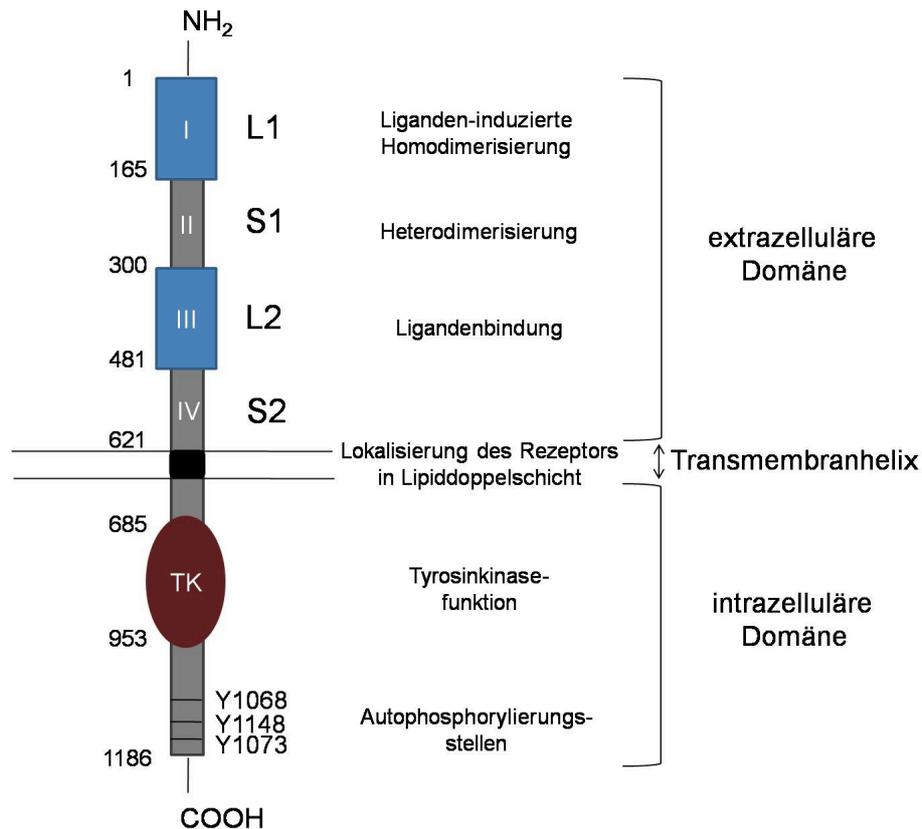


Abb. 3: Schematische Darstellung des EGFR. Dargestellt sind die extrazelluläre Domäne mit der Ligandenbindungsfunktion (Untereinheiten L1 (I) und L2 (III)) sowie der Dimerisierungsfunktion (Cystein-reiche Regionen S1 (II) und S2 (II)), die Transmembranhelix sowie die intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinasefunktion und Aktivierungsstellen (Autophosphorylierungsstellen).

1.2.2. EGFR-Aktivierung

Der inaktive EGF-Rezeptor liegt autoinhibiert vor. Dies kommt dadurch zustande, dass ohne Bindung eines Liganden die Domäne II des extrazellulären Bestandteils an Domäne IV gebunden ist, und dadurch die für die Dimerisierung entscheidende Region verdeckt wird. Bindet ein Ligand an die Domänen I (L1) und III (L2), erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors, bei dem es zu einer Rotation der Domänen I und II um 130° kommt. Dies bewirkt ein Freisetzen des Dimerisierungsarms mit anschließender Dimerisierung und Autophosphorylierung der Tyrosinreste [122–124]. An diese phosphorylierten Tyrosine können in Folge verschiedene Proteine, wie z.B. Adaptorproteine oder Enzyme mit SH2 (**S**rc-**h**omology **2**)- oder PTB-Domäne (**P**hosphotyrosin-**B**indungsdomäne) binden. Bei diesen Domänen handelt es sich um Domänen, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln und ihrerseits Phosphorylierungsstellen aufweisen, sodass die Bindung dieser Proteine an den EGFR zu einer Erweiterung der Interaktionsmöglichkeiten und putativen Signalkaskaden führt [120,122,123].

1.2.3. Liganden der EGFR-Proteinfamilie und Induktion der Rezeptordimerisierung

Die Mitglieder der EGFR-Proteinfamilie werden durch eine Vielzahl an EGF-ähnlichen Liganden aktiviert. In Abhängigkeit ihrer Affinitäten und Spezifitäten, lassen sie sich in 4 verschiedene Kategorien unterteilen. So binden der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), Amphiregulin (AR) und der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF- α) spezifisch an den EGFR und bilden die erste Gruppe von Liganden. Im Gegensatz dazu binden Betacellulin (BTC), der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (HB-EGF) und Epiregulin an den EGFR (ErbB1) und ErbB4. Neureguline (NRGs) oder Neu-Differenzierungsfaktoren (NDFs) binden und aktivieren ErbB3 und ErbB4, wobei NRG1 und NRG2 Liganden für beide Rezeptoren darstellen, wohingegen NRG3 und NRG4 nur ErbB4 als Liganden dienen [122]. Alle genannten Wachstumsfaktoren teilen eine gemeinsame EGF-Domäne mit sechs konservierten Cystein-Resten, die drei intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Gebildet werden die EGF-ähnlichen Liganden als glykosylierte transmembrane Vorstufen, die proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten und so zum funktionsfähigen Liganden werden [122,125]. Hoch- und niederaffine Liganden induzieren Signalwege durch Bindung an den Rezeptor und eine anschließende Transaktivierung durch die Bildung von Homo- oder Heterodimeren. Die Heterodimerbildung kann hierbei zwischen allen Mitgliedern der ErbB-Familie, also ErbB1 bis ErbB4, erfolgen. Eine entscheidende Rolle für die Dimerisierung und Aktivierung innerhalb der ErbB-Familie spielt der Rezeptor ErbB2. Studien zeigen, dass dieser durch Heterodimerisierung mit dem Liganden-gebundenen EGFR transphosphoryliert wird [126,127] und zusammen mit dem EGFR oder ErbB3 eine synergistische Wirkung zeigt [128,129]. Für ErbB2 konnten keine eigenen Liganden nachgewiesen werden, wodurch ErbB2 als bevorzugter Heterodimerisierungspartner aller anderen Mitglieder innerhalb der EGFR-Proteinfamilie fungiert. Dieser reduziert die Dissoziation der Liganden vom Rezeptor und verlängert so die Aktivierung verschiedener Kaskaden, wie z.B. des MAP-Kinase-Signalwegs [122,130,131]. Weiterhin haben mechanistische Studien des Liganden-Rezeptorkomplexes gezeigt, dass die Liganden eine hochaffine und eine niedrigaffine Bindestelle für die Rezeptoren besitzen und somit bivalent sind. So induziert EGF durch eine hochaffine Bindung die Homodimerisierung des EGFR [132] und NRG mittels niedrigaffiner Bindung die Heterodimerisierung mit ErbB2 [133].

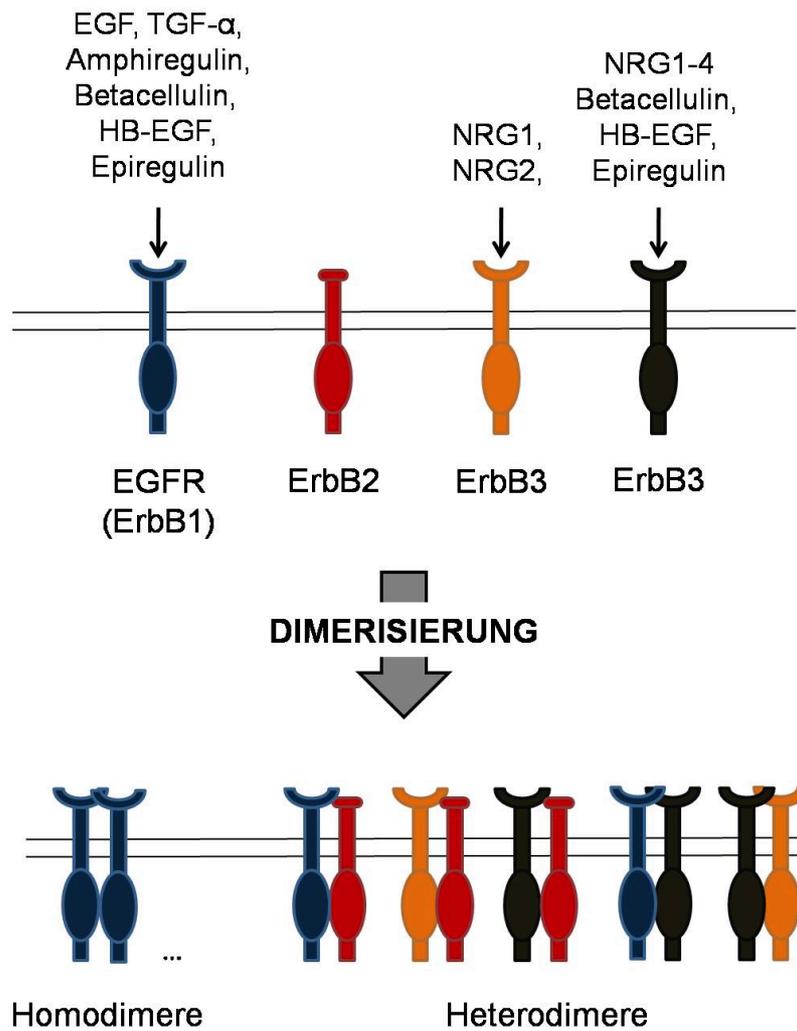


Abb. 4: Schematische Darstellung der ErbB-Rezeptorfamilie und ihrer jeweiligen Liganden und Dimerisierungspartner (modifiziert nach [134]).

1.2.4. EGFR-Signalkaskaden

Auf Grund der verschiedenen Liganden und diversen Interaktionspartner ist der EGFR in eine Vielzahl von Signalkaskaden involviert (Abb. 5) [122,135]. Hierbei ist der MAP (**Mitogen-Activated Protein**)-Kinase-Signalweg am besten untersucht. Zu den verschiedenen MAP-Kinasen, die als Ziele des EGF-Rezeptors identifiziert werden konnten, gehören ERK1 und ERK2 (**Extracellular Signal-Regulated Kinases**), die JNKs (**c-Jun-N-terminal Kinases**) sowie die p38-mitogenaktivierten Kinasen (p38, Erk5). Beim ERK1/2-Signalweg werden nach Ligandenbindung und Dimerisierung des EGFR zunächst die Adaptorproteine Shc (**SH2-containing protein**) und Grb2 (**Growth factor receptor-bound protein 2**) rekrutiert und an die Autophosphotyrosinstellen gebunden. Über den Nukleotid-Austauschfaktor Sos (**Son of Sevenless**) wird das kleine G-Protein Ras (**Rat Sarcoma**) aktiviert, welches auf Grund seiner GTPase-Funktion mit der Kinase Raf (**Rat fibrosarcoma**) interagiert. Diese Aktivierung führt zur Translokation von Raf an der Zellmembran und gleichzeitig zur Aktivierung der Kinasen MEK1/2 sowie ERK1/2 [122,136–139]. ERK1/2 führt dann zur Phosphorylierung und Aktivierung vieler verschiedener Proteine, so z.B. von Transkriptionsfaktoren wie NFAT (**Nuclear Factor of Activated T-cells**), c-myc, CREB (**cAMP Response Element-binding Protein**), c-fos (**FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog**), STAT3 (**Signal Transducer and Activator of Transcription 3**) oder Elk-1 (ETS-Like Gene), sodass ein breites Spektrum an zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Zellvitalität, aber auch Apoptose und Stressantworten reguliert wird [140–142]. Neben den oben beschriebenen Signalkaskaden, werden die MAP-Kinasen JNK und p38 über die Tyrosinkinase-Domäne reguliert [122]. So erfolgt die JNK-Aktivierung über das kleine G-Protein Rac (**Ras-related C3 botulinum toxin substrate**) und Cdc42Hs (**Cell division control protein 42 homolog**) [143]. Mit JIK (**JNK/SAPK-Inhibitory Kinase**) konnte eine Serin/Threonin-Kinase identifiziert werden, die die JNK-Aktivierung als Antwort auf eine EGFR-vermittelte negative Regulation inhibiert [144], wohingegen für das Adaptorprotein Crk eine stimulatorische Funktion in der JNK-Aktivierung nachgewiesen wurde [145]. Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor vermittelt außerdem die schwache Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) [146]. Auf Grund der Tatsache, dass der EGFR im Vergleich zu anderen Rezeptortyrosinkinasen keine Bindestelle für die SH2-Domäne der PI3K besitzt, muss diese Aktivierung indirekt erfolgen. Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung der PI3K über das Adaptorprotein Gab1 (**GRB2-Associated-Binding Protein**) vermittelt wird [147]. Gleichzeitig führt die Aktivierung der PI3K zur Bildung von Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PIP3), welches wiederum zu einer erhöhten Aktivität von Gab1 führt. Es handelt sich hierbei um eine positive Rückkopplung, die ihrerseits durch die Phosphatase PTEN (**Phosphatase and Tensin Homolog**), welche PIP3 hydrolysiert, reguliert wird [122]. Ein wichtiges Ziel des PI3K-Signalweges ist die Proteinkinase B (PKB)/Akt, welche durch die Aktivierung von NFκB

antiapoptotische Wirkung zeigt und eine Rolle im Zellzyklus spielt [148]. Die EGFR-vermittelte Aktivierung der zytosomatischen Tyrosinkinase c-Src (**C**ytoosolic **v**-src **A**vian **S**arcoma **V**iral **O**ncogene **H**omolog) vermittelt ebenfalls diverse Zellfunktionen wie die Organisation des Zytoskeletts und das Vermitteln cancerogener Signalwege [149,150]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass c-Src und der EGFR koexprimiert werden und synergistisch auf die Zellproliferation, Invasivität und die Tumorbildung wirken [151,152]. C-Src kann sowohl indirekt über die Ral-GTPase aktiviert werden [153] als auch durch direkte Bindung an den EGFR, wodurch zwei Tyrosinreste phosphoryliert werden [154]. Eine EGF-abhängige c-Src-vermittelte Aktivierung wurde für eine Vielzahl an Proteinen, wie z.B. Jak2 (**J**anus **K**inase **2**) oder STAT3 beschrieben [122].

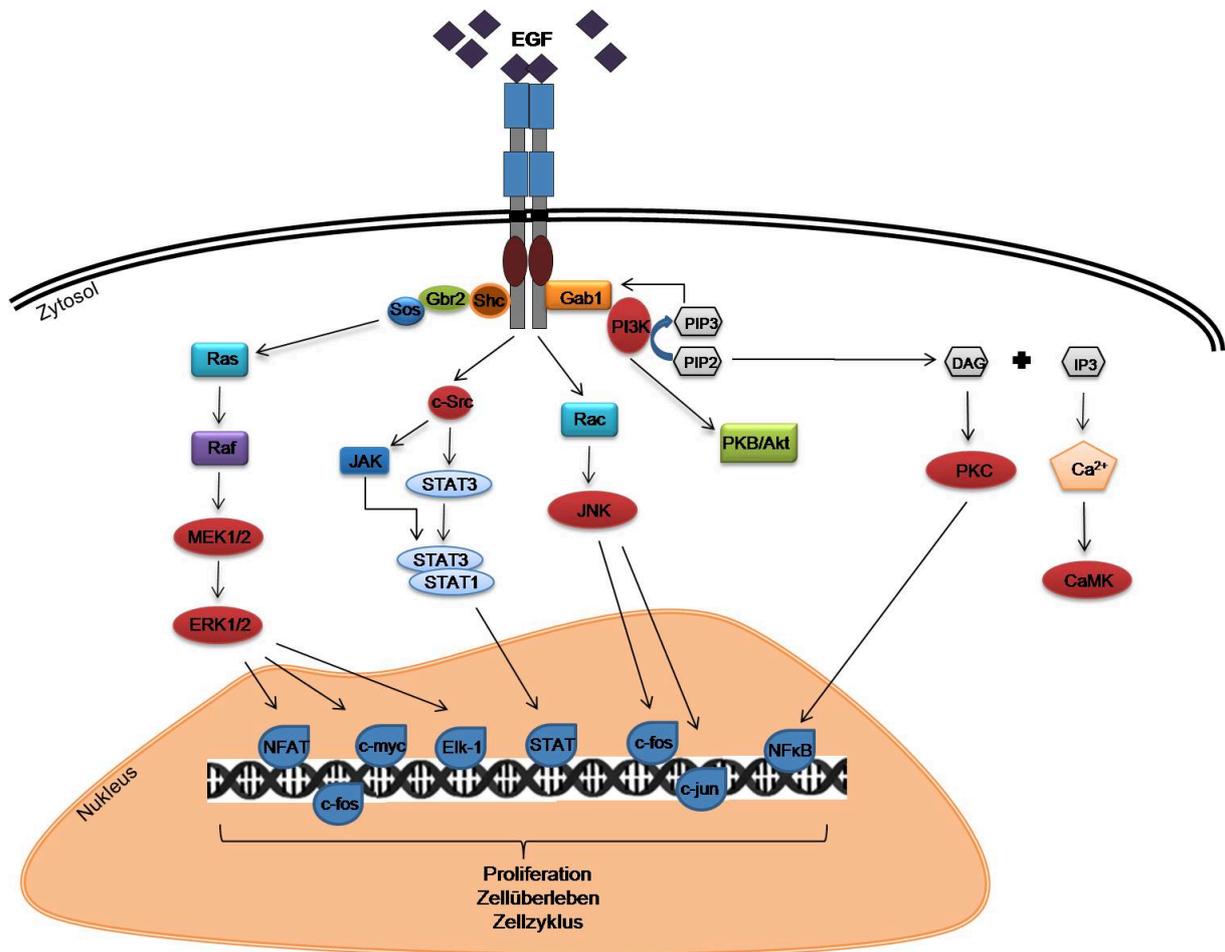


Abb. 5: Schematische Darstellung ausgewählter EGFR-Signalkaskaden (modifiziert nach [122,135]).

1.3. Zusammenwirken von MR und EGFR

Die Interaktion des MR mit dem EGFR kann sowohl mittels Transaktivierung in einer nicht-genomischen Weise [100,155] als auch genomisch mittels Regulation der Genexpression erfolgen [156,157]. Diese MR-abhängige Erhöhung der EGFR-Expression konnte unter anderem in Herz, Aorta und Nieren nachgewiesen werden. Dabei bewirkt die MR/Aldosteron-induzierte Steigerung der EGFR-Expression eine Erhöhung der Menge an Rezeptormolekülen und damit gleichzeitig die Verfügbarkeit für vasoaktive Substanzen wie Endothelin-1 und Angiotensin II [156,158–160]. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass die nicht-genomische Interaktion durch die Bindung des EGFR an die EF-Domäne des MR erfolgt, und die vollständige Responsivität auf die Behandlung mit Aldosteron nur erzielt wird, wenn mindestens die Domänen C, D sowie E/F vorhanden sind [161,162]. Die durch die Interaktion von MR und EGFR beeinflussten Signalmoleküle sind sehr vielschichtig und umfassen unter anderem die NADPH-Oxidase, c-Src, die Proteinkinasen C und D (PKC bzw. PKD), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die Rho/Rhokinase, ki-Ras-2a (**K**irsten **R**at **S**arcoma **V**iral **O**ncogene **H**omolog) und Calcium-Signalwege [100,155,163–166]. Ein Überblick über die durch MR-EGFR-Interaktion verursachten Mechanismen soll in den folgenden Abschnitten gegeben werden.

1.3.1. Physiologische Relevanz der MR-EGFR-Interaktion

Ein physiologischer Prozess von entscheidender Bedeutung ist die MR-EGFR-abhängige Regulation von Natriumionen in der Niere. So konnte gezeigt werden, dass der EGF-Rezeptor als Vermittler zwischen Aldosteron-aktiviertem MR und der Proteinkinase D fungiert. Dies bewirkt in M1-Zellen des Sammelrohres eine erhöhte Aktivität des epithelialen Natriumkanals ENaC [155,167]. ENaC sorgt zusammen mit der Na^+/K^+ -ATPase für den transepithelialen Transport von Na^+ -Ionen und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Na^+ und K^+ -Konzentrationen im Blut, in Epithelien sowie in extra-epithelialen Flüssigkeiten, indem er Na^+ -Ionen aus Primärharn und Darmlumen rückresorbiert. In humanen renalen epithelialen Zellen des proximalen Tubulus (RPTEC) erfolgte weiterhin der Nachweis einer MR-EGFR-induzierten Stimulation der Expression und Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers NHE3 [168], sowie eine Aktivierung von NHE1 in MDCK-Epithelzellen (Madin Darby Canine Kidney), wo es an der Regulation des zellulären pH-Wertes und des Volumens beteiligt ist [163]. In ventrikulären Myozyten der Ratte wurde weiterhin gezeigt, dass die Aldosteron-induzierte NHE1-Aktivierung durch die MR-Antagonisten Spironolakton und Eplerenon sowie den EGFR-Kinase-Inhibitor AG1478 gehemmt werden kann. Dies bekräftigt die Hypothese, dass diese NHE1-Stimulation durch eine Transaktivierung des EGFR vermittelt wird [169].

1.3.2. Pathophysiologische Bedeutung der MR-EGFR-Interaktion

Neben der physiologischen Relevanz der Interaktion von Aldosteron-stimuliertem MR und EGFR haben die pathophysiologischen Effekte größere Bedeutung erlangt. So wurden in den letzten 10 Jahren Arbeiten veröffentlicht, in denen das Zusammenwirken von MR und EGFR in verschiedenen Geweben mit Veränderungen, wie z.B. Fibrose, Entzündung, Proliferation oder auch dem Altern in Verbindung gebracht werden.

1.3.2.1. Remodeling

Als Remodling werden Umbauprozesse des Gewebes bezeichnet, die als Reaktion auf physiologische oder pathophysiologische Belastungen wie z.B. Läsionen oder Entzündungsprozesse ablaufen. Einen ersten Hinweis für die Bedeutung der MR-EGFR-Interaktion für diese pathophysiologischen Veränderungen gaben Dorrance et al. in ihren Arbeiten mit dem Nachweis, dass die Behandlung von hypertensiven, Schlaganfallgefährdeten Ratten (SHRSP) mit dem MR-Antagonisten Spironolakton zu einer Minderung des Risikos eines Hirninfarktes führt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Beobachtung mit der Reduktion des EGFR-mRNA-Gehaltes nach Behandlung mit Spironolakton einhergeht, und dadurch ein Umgestalten des Gewebes der Blugefäße im Gehirn verhindert wird [170]. Für das Mineralokortikoid Deoxycorticosteron (DOCA), welches ein Derivat des Progesterons und Zwischenstufe in der Synthese des Aldosterons ist, wurde beschrieben, dass die Gabe in hypertensiven DOCA-Ratten zu Veränderungen der Gefäßfunktionen durch Erhöhung des basalen Tonus und zu EGF-induzierten Kontraktionen führt. In diesen Studien führte die Behandlung mit PI3-Kinase- oder EGFR-Kinase-Antagonisten zu einer Suppression dieser Gefäßveränderungen [171]. Solche arteriellen Kontraktionen, die auf einer Überexpression des EGFR beruhen, konnten bereits vorher nachgewiesen werden [11,12]. Außerdem wurde ein Einfluss des Mineralokortikoids DOCA auf den inneren und äußeren Durchmesser sowie auf die Dicke der Gefäßwände beschrieben, sodass Dorrance et al. postulieren, dass die Gabe des Mineralokortikoids zur Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) führt [10]. Dass die durch MR/Aldosteron-induzierte Transaktivierung des EGFR die Proliferation von VSMCs und mesangialen Zellen bedingt, konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen bestätigt werden [17,18,155,164,172]. Diese proliferatorischen Effekte waren dabei durch den Aldosteron-Antagonisten Spironolakton hemmbar [173]. Die Bedeutung der Interaktion von MR und EGFR wurde außerdem anhand synergistischer Effekte von Aldosteron und Angiotensin II nachgewiesen. So führt die simultane Gabe beider Liganden als Antwort auf die Phosphorylierung von EGFR, ERK1/2 sowie ki-Ras-2a und MKP-1 zur Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [165]. Weiterhin bewirkt die Aldosteron-abhängige EGFR-Transaktivierung die Proliferation von mesangialen Zellen über zwei verschiedene dem EGFR nachgeschaltete Signalkaskaden. Zum einen erfolgt dies mittels Phosphorylierung der

PI3K/Akt und mTOR-Signalkaskade und zum anderen über ki-Ras-2a und den MAP-Kinase-Signalweg [174]. In neueren Veröffentlichungen zeigen EGFR-defiziente Mäuse mit unvollständigem EGFR-*Knock-out*, der lediglich zu einer reduzierten EGFR-Kinaseaktivität führt, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen die gleiche Responsivität auf Angiotensin II und Phenylephrin (Derivat des Adrenalin). In diesem Modell wird eine Aldosteron-induzierte EGFR-abhängige vaskuläre Dysfunktion, nicht aber vaskuläres Remodeling beschrieben [175]. Diese Daten werden durch Experimente an dominant negativen EGFR-Mäusen unterstützt, in denen gezeigt werden konnte, dass die Aldosteron-induzierte Angiotensin II-vermittelte kardiale Hypertrophie sowie die Expression von Markergenen wie Kollagen I, II oder III in DN-EGFR-Mäusen und Wildtyp-Tieren identisch war [176]. Diese Daten sind allerdings auf Grund des verwendeten Modells kritisch zu bewerten, da auf Grund des unvollständigen *Knock-outs*, welcher nur zur Reduktion der EGFR-Kinaseaktivität führt, EGFR-abhängige Effekte nicht vollkommen ausgeschlossen werden können.

1.3.2.2. Entzündung/Inflammation

Neben den in Abschnitt 1.3.1. beschriebenen Mechanismen des Remodelings spielt das Zusammenwirken von MR und EGFR eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Entzündungsprozessen innerhalb des renokardiovaskulären Systems [92,177]. Ein Aldosteron-induzierter Anstieg der 12-,15-Lipoxygenase-Expression löst in den Gefäßen pro-entzündliche Veränderungen aus, die durch die Hemmung des EGFR mit dem Inhibitor AG1478 verhindert werden können [178]. Diese Lipoxygenase verursacht die Produktion von Derivaten der Hydroxyeicosatetraensäure (12- und 15-HETE [**H**ydroxyeicosatetraensäure] und HPETE [**H**ydroperoxyeicosatetraensäure]), welche dafür bekannt sind, die vaskuläre Kontraktilität, das vaskuläre Wachstum, die Migration sowie die Oxidation von LDL (**L**ow **D**ensity **L**ipoprotein) zu erhöhen [178]. In epithelialen Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass der Aldosteron-induzierte Anstieg der ENaC-Rezeptoren in der Zellmembran zu einem kurzzeitigen Anschwellen und einer langzeitigen Versteifung der Zellen führt [179]. Dass die Insertion von ENaC durch die Proteinkinase D vermittelt wird, welche abhängig von der Phosphorylierung des EGFR ist, wurde weiterhin in Nierenzellen beschrieben [155,167]. Ein ähnlicher Mechanismus im Endothel wäre denkbar.

1.3.2.3. Alterungsprozesse

Ein Zusammenhang zwischen Alterungsprozessen und der Interaktion von MR und EGFR konnte ebenfalls hergestellt werden. So wurden in jüngeren adulten Ratten nach Aldosteron-abhängiger EGFR-Überexpression entzündungsfördernde Mechanismen in glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen. Gleichzeitig kommt es zu Steigerung der Menge an mRNA und Protein des MR in gealterten adulten Ratten sowie einer Erhöhung der EGFR-Expression in der Aorta. Es wird daher postuliert, dass die EGFR-vermittelten Effekte von

Aldosteron pro-entzündliche Signalwege fördern, die mit dem arteriellen Altern in VSMCs assoziiert sind [159]. Eine ähnliche Beziehung zwischen MR-induzierten Mechanismen und dem Altern von Gefäßen wurde außerdem durch Min et al. beschrieben. Diese postulieren in ihren Arbeiten ein synergistisches Zusammenwirken von MR/Aldosteron und Angiotensin II/Angiotensin II-Rezeptor. Dieses führt zum einen zu einer EGFR- und ki-Ras-2a-aktivierten Proliferation und zum anderen zu einer durch die Erhöhung der NADPH-Oxidase-Aktivität und NFκB und AP-1 vermittelten Seneszenz [165,180].

1.3.2.4. Fibrose

Obwohl die fibrotische Wirkung von Aldosteron im renokardiovaskulären System durch viele Arbeitsgruppen nachgewiesen wurde, konnte die Beteiligung des EGFR bisher nur indirekt gezeigt werden [82,181,182]. Als Fibrose bezeichnet man die krankhafte Vermehrung des Bindegewebes, wodurch es zu einer Verdrängung des Parenchyms und zur Verhärtung des betroffenen Gewebes kommt. So bewirkt die fibrotische Veränderung in den betroffenen Geweben starke funktionelle Einschränkungen. Hypertensive Ratten zeigen eine erhöhte Kollagensynthese nach Aldosteron-induzierter Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-Src sowie NADPH-Oxidase, welche in Folge die Phosphorylierung von ERK1/2 und p38 bewirkt [183]. Verschiedenen Arbeiten bestätigen, dass eine solche Aldosteron-abhängige c-Src-Aktivierung eine erhöhte Aktivierung des EGFR bewirkt [100,155,166]. Da die Kollagen-Synthese in renalen Fibroblasten aufgrund einer Aldosteron-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 verstärkt ist, wird postuliert, dass die EGFR-Transaktivierung als Mediator innerhalb dieses Signalweges fungiert [184]. Als zentraler Vermittler fibrotischer Mechanismen wurde TGF-β in der Niere identifiziert. Chen et al. bewiesen, dass die Hemmung des EGFR die Angiotensin II-induzierte, durch TGF-β-vermittelte, renale Fibrose verhindert [185]. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die MR/Aldosteron-induzierte Fibronektinsynthese in NRK49f-Zellen (Fibroblastenzelllinie der Niere) unabhängig von der EGFR-Transaktivierung über die Aktivierung von JNK und AP-1 erfolgt, obwohl die Inkubation mit Aldosteron zu einer verstärkten EGFR-Phosphorylierung führt [186]. Ein Indiz für die Relevanz der MR-EGFR-Interaktion liefern Zhang et al. in ihren Studien. Ihre Untersuchungen zeigen, dass die Fibronektinsynthese in mesangialen Zellen der Ratte nach Inkubation mit Aldosteron über eine Stimulation von ERK1/2 und NHE1 erfolgt. Wie bereits oben beschrieben, handelt es sich sowohl bei ERK1/2 als auch NHE1 um Ziele der MR-EGFR-Interaktion [187]. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass Aldosteron die Zellen möglicherweise lediglich für die Wirkung anderer Stressoren, wie z.B. chemische Radikale, empfänglicher macht. So erfolgte in humanen glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta (HAoSMCs) der Nachweis einer H₂O₂-induzierten Steigerung des Gehaltes an Kollagen I, III und IV, welche durch Aldosteron unterstützt wurde und durch MR-Antagonisten und EGFR-Kinase-Inhibitoren hemmbar war [188].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die MR/Aldosteron-induzierte Transaktivierung des EGFR ein breites Spektrum an Signalmolekülen und -kaskaden involviert und aktiviert und daher eine Vielzahl physiologischer sowie pathophysiologischer Prozesse vermittelt (Abb. 6). Besonders die pathophysiologischen Effekte in Form von vaskulären Dysfunktionen, Proliferation, Entzündung, Altern und Fibrose sind von großer medizinischer und pharmakologischer Relevanz, da sie Ursache vieler renokardiovaskulärer Krankheitsbilder sind. Die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen ist daher relevant für die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.

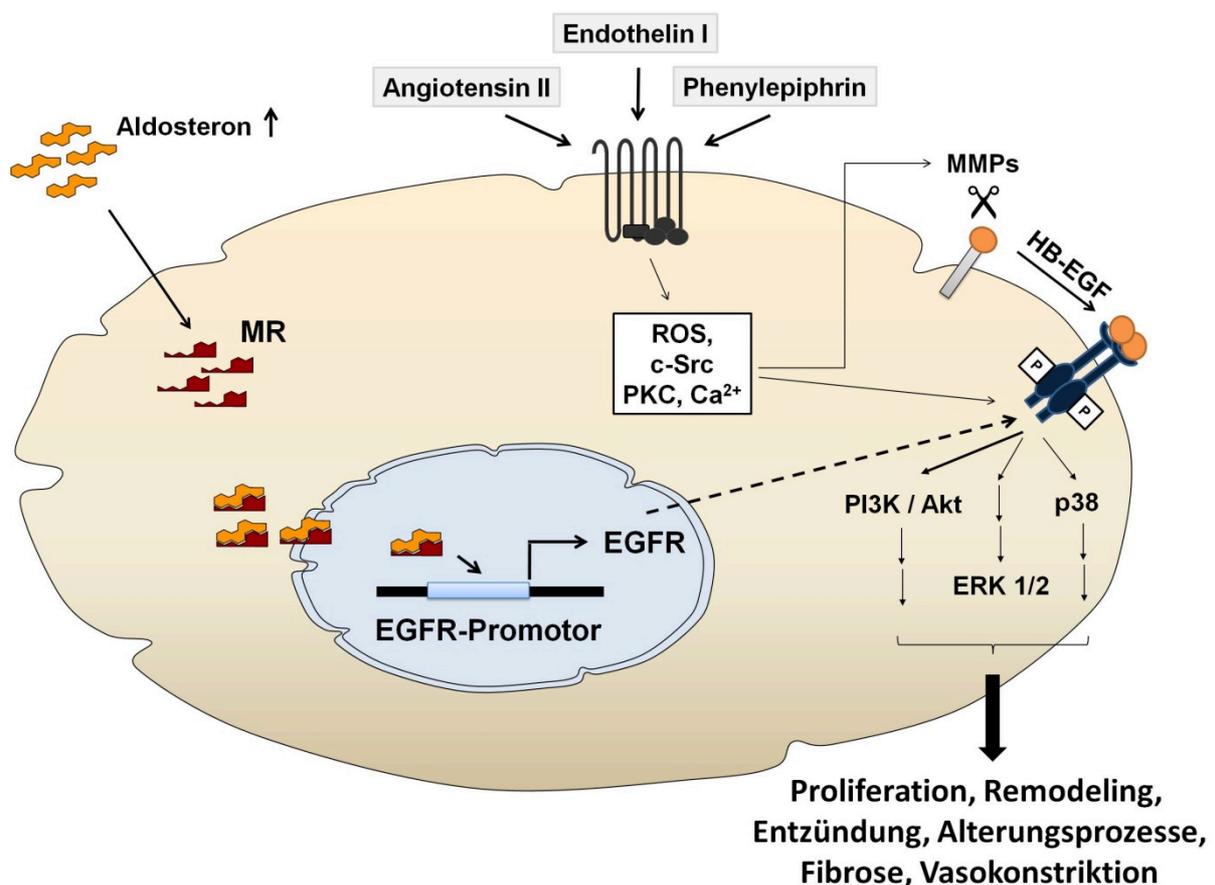


Abb. 6: Schematische Darstellung des Zusammenwirkens von MR und EGFR sowie der Transaktivierung des EGFR über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits einleitend erwähnt, zeigen die klinischen Studien RALES, EPHESUS und EMPHASIS-HF, dass die Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz oder Patienten nach Myokardinfarkt mit MR-Antagonisten eine 15%ige bzw. 30%ige Reduktion der Mortalität und Morbidität bewirkt [7–9]. Es wird postuliert, dass diese MR-Antagonisten Remodelingprozesse in Geweben des Herz-Kreislauf-Systems hemmen. Dass die Interaktion von MR und EGFR einen entscheidenden Beitrag zur Aktivierung pathophysiologischer Signalkaskaden leistet, konnte in einer Vielzahl an Arbeiten gezeigt werden [100,155,164,170]. Außerdem verstärkt der EGFR die schädigende Wirkung vasoaktiver Substanzen. Die Aldosteron-induzierte Überexpression des EGFR wurde durch Krug et al. demonstriert. Es wurde beschrieben, dass diese Induktion MR-spezifisch und unabhängig vom GR ist [158]. Auf Grund dieser Ergebnisse, wurde der Promotor des EGF-Rezeptors ausgewählt, um gezielt nach Mineralokortikoid-responsiven Elementen zu suchen. In der Vergangenheit konnten auf dem EGFR-Promotor bereits zwei Regionen identifiziert werden, die funktionell mit dem MR interagieren und von diesem aktiviert werden [156,189].

Ziel der Arbeit ist daher die Untersuchung des Mechanismus der MR-EGFR-Promotor-Interaktion. Hierfür sollten (i) mittels Reporteragen-Assays das Mineralokortikoid-responsive Element (MRE) auf dem EGFR-Promotor eingegrenzt sowie (ii) weitere putative Kofaktoren mittels bioinformatischer Analysen identifiziert werden. Die putativen Kofaktoren sollten anschließend (iii) hinsichtlich ihrer Relevanz und tatsächlichen Beteiligung am Mechanismus validiert und charakterisiert werden. Anhand des identifizierten MREs sollte (iv) mittels eines genomweiten Sequenzvergleichs nach weiteren spezifischen, MR-regulierten Genen gesucht und (v) diese Zielgene validiert werden, um so eventuell einen generellen Wirkmechanismus des MR ableiten zu können. Weiterhin sollte (vi) die pathophysiologische Relevanz für das kardiovaskuläre System näher eingegrenzt werden.

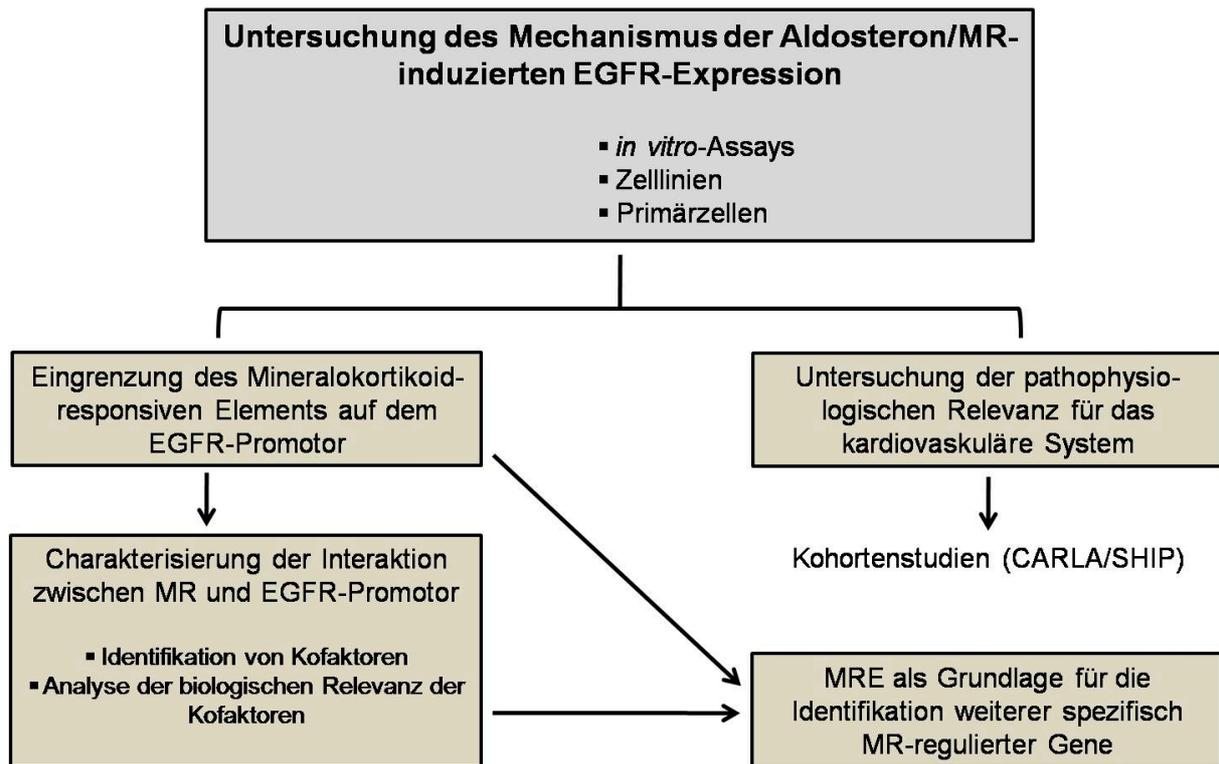


Abb. 7: Zusammenfassung der Zielsetzungen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinien

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293), humane Nierenepithelzellen (HK2) sowie aortale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte (A7r5), bezogen von der American Type Culture Collection (Rockville, MD), wurden in DMEM/Ham's F-12-Medium mit 10% FCS oder DMEM-Medium mit 1,5 g/l Bicarbonat, 4,5 g/l Glucose und 10% FCS kultiviert. Die Kultivierung einer Zelllinie des proximalen Tubulus des Opossums (OK), erhalten von Dr. Biber (Institut für Physiologie, Universität Zürich) erfolgte in MEM-Medium (pH 7,4) mit Earl's salts, nicht-essentiellen Aminosäuren und 10% FCS. Primärzellen in Form von humanen glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta (HAoSMC) wurden von Promocell (Heidelberg, Deutschland) erworben und in Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit 5% FCS kultiviert.

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (100 mm) bei 37°C in einer Wasserdampf-gesättigten 5% CO₂-haltigen Atmosphäre bis zur Konfluenz kultiviert und entsprechend des Wachstums 1-2x wöchentlich subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen mit EDTA-Lösung (0,2 g/l) gewaschen und anschließend mit Trypsin von der Unterlage gelöst. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die Trypsinwirkung beendet und die Zellen für Versuche oder weitere Kultivierung angesät. Um eine hormonelle Basalstimulation zu vermeiden, wurden die Zellen jeweils 24 h vor einem Experiment auf serumfreies Medium ohne Zusätze umgestellt.

2.1.2. Transiente Transfektionen

2.1.2.1. Plasmide/ Vektoren

Transiente Transfektionen erfolgten im Fall der HEK293- und HK2-Zellen mit Hilfe von Polyfect Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie im Fall der OK-Zellen mittels Effectene (Qiagen, Hilden, Deutschland) in serumfreiem Medium. Das Ruhigstellen der Zellen erfolgte durch 24-stündige Inkubation in Medium ohne Serum und Steroide. Die Vektorkarten sowie Webseiten-Adresse zur Sequenz der einzelnen Plasmide befinden sich im Anhang (siehe Anhang A2).

TA Cloning Kit/ pCR2.1

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren wurde als Zwischenvektor pCR2.1 aus dem TA Cloning Kit (Invitrogen/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Vorteil des bereits linearisierten Plasmids ist der 3'-Thymidin-Überhang, der mit den Einzelstrang-Adenosinresten der mit Taq-Polymerase

synthetisierten PCR-Stücke reagieren kann. Weitere Merkmale: T7-Promotor; Multi Cloning Site (MCS); LacZ-Promotor und LacZ α -Gen; Kanamycin sowie Ampicillin-Resistenz.

pSEAP2-Basic

Der binäre Expressionsvektor pSEAP2-Basic (Clontech; Mountain View, USA) eignet sich durch dessen Reporter gen, die Sekretorische Alkalische Phosphatase (SEAP) besonders, um potentielle Promotoren oder Promotorfragmente zu identifizieren. Weitere Merkmale des Plasmids: MCS upstream des SEAP-Gens, SV40-Polyadenylierungssignal, Ampicillin-Resistenz; Transkriptionsblocker.

pEGFP-C1

Der pEGFP-C1-Binärvektor (Clontech; Mountain View, USA) kodiert eine Variante des GFP-Proteins, welches optimiert wurde, um eine höhere Expression in Säugerzellen und eine stärkere Fluoreszenz erzielen und dient somit dem Nachweis von Proteinen in Zellen oder Geweben. Weitere Merkmale des Vektors: MCS downstream des EGFP-Gens, SV40-Polyadenylierungssignal, SV40-Promotor, Neomycin-/ Kanamycin-Resistenz.

pCDNATM 3.1/His A,B & C

Der Expressionsvektor pCDNATM 3.1/His A, B oder C (Invitrogen, Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) enthält einen CMV (Cytomegavirus) - Promotor, der eine Überexpression von Zielgenen in Säugerzellen erlaubt. Weiterhin enthält er ein XPress Epitop-Tag und ein Polyhistidin-Tag (6x), was die Aufreinigung der Zielgene erlaubt. Weitere Merkmale des Plasmids: T7-Promotor, MCS, Enterokinase-Erkennungssequenz, Geneticin- und Neomycin-/ Kanamycinresistenz.

2.1.2.2. siRNA

Spezifische ON-TARGETplus SMARTpool siRNA gegen SP1 und SP3 und als Negativkontrolle ON-TARGETplus Non-targeting pool siRNA wurde mittels DharmaFECT-Reagenz (alles bezogen von Thermo Scientific Dharmacon; Epsom; UK) transient in HEK293-Zellen transfiziert. Die HEK293-Zellen wurden hierfür in 6-well-Platten angesät und nach Angaben des Herstellers transfiziert. Aus diesen Zellen wurde im Anschluss nach 48 h, 72 h und 96 h RNA isoliert und Realtime-PCRs durchgeführt. Proteine für Western Blot-Analysen wurden 72 h, 96 h und 120 h nach Transfektion isoliert. HEK293-Zellen für Reporter gen-Assays wurden in 24-well-Platten angesät und für 96 h mit siRNA inkubiert.

2.1.2.3. Reporter-gen-Assays

Reporter-gen-Assays mit unterschiedlich langen Fragmenten des EGFR-Promotors sowie verschiedenen Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) oder Mutanten des EGFR-Promotors wurden für Aktivitätsstudien verwendet. Hierfür wurden die verschiedenen Fragmente mit der Sekretorischen Alkalischen Phosphatase (SEAP) des pSEAP2-Basic verknüpft. Um den Einfluss des Mineralokortikoidrezeptors auf den EGFR-Promotor zu analysieren, wurden die entsprechenden Konstrukte jeweils zusammen mit dem, für den humanen Mineralokortikoidrezeptor kodierenden, pEGFP-MR-Plasmid transient in HEK293- oder OK-Zellen transfiziert. Zum Erfassen der Transfektionseffizienz und zur Analyse der basalen Aktivität dienten als interne Kontrollen konstitutiv exprimiertes pCDNA3.1His-LacZ- (Invitrogen/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) und pSEAP2-Basic-Plasmid. 24 h nach Transfektion der Plasmide wurden die Zellen entweder mit DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma-Aldrich; München, Deutschland) oder 10 nM Aldosteron (Fluka Analytical/ Sigma-Aldrich; St. Gallen, Schweiz; gelöst in DMSO) für weitere 48 h inkubiert. Die Durchführung der Experimente erfolgte in 24-well-Platten. Nach Transfektion und Inkubation der Zellen wurde das Medium mit einer sterilen Pipette abgenommen und die Zellen in 100 µl Lysepuffer (20 mM MOPS; 0,1 % Triton-X-100, pH 7,4) suspendiert. Nach Zentrifugation der Lysate wurden Proteingehalt (BCA-Messung) und β -Galaktosidase-Wert bestimmt. Zur Messung der SEAP-Aktivität wurden 60 µl des Zellmediums mit einer adäquaten Menge SEAP-Puffer (60 mM L-Homoarginin; 3 mM MgCl₂; 0,2 mM ZnCl₂; 100 mM Tris-HCl, pH 9,3) versetzt und für 30 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert, um unspezifische Phosphatreste zu inaktivieren. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden 100 µl Substrat in Form von AttoPhos-AP-Lösung (Endkonzentration 0,5 mM; Promega; Fitchburg, Madison, USA) zu 100 µl des Probengemischs hinzugegeben. Das Messen der Fluoreszenzentwicklung erfolgt mit Hilfe des TECAN Infinite M200 (TECAN; Männedorf, Schweiz) bei einer Anregung von 435 nm und Emission von 555 nm für 60 min bei RT.

2.2. EGFR- *Knock-out*- und Wildtyp- Mäuse

Die für die RT² Profiler PCR Arrays sowie qPCR-Validierung verwendete RNA wurde aus Herzgewebe und isolierten Kardiomyozyten von EGFR-*Knock-out*-Mäusen (EGFR $\Delta\Delta$ VSMC) und -Wildtyp-Mäusen (EGFR ^{+/+} VSMC) isoliert [190,191]. Der *Knock-out* des EGFR erfolgte durch Kreuzung von C57BL/6-Mäusen mit LoxP-flankierten EGFR-Allelen (EGFR *f/f*) und transgenen Mäusen mit einer SM22-Promotor regulierten Cre-Rekombinase. Dieser SM22-Promotor ermöglicht einen gewebespezifischen EGFR-*Knock-out* in den glatten Gefäßmuskelzellen des Herzens (VSMCs) und den Kardiomyozyten. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch Nachweis der LoxP-flankierten EGFR-Allele sowie der Cre-Rekombinase [190,191]. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in Scantainer Ventilated Cabinets.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit Hilfe des InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitrek/ STRATEC Molecular; Berlin, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers. Hierbei beruht die Isolation der RNA auf der Bindung der Nukleinsäuren an die Silikamatrix der RNA-Säulen. Anschließende Waschschriffe eliminieren Verunreinigungen mit Proteinen und DNA. Gelöst wurde die RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser von Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

2.3.2. Quantifizierung von RNA

Die Quantifizierung der RNA-Proben erfolgte mit dem NanoVue Spectrophotometer (GE Health Care Europe; Freiburg, Deutschland) bei 260 nm (Konversionsfaktor für Absorption 1,0 = 40 µg/ml).

2.3.3. Reverse Transkription und Realtime-PCR

2.3.3.1. DNase-Verdau der isolierten RNA

Je 1 µg der isolierten RNA wurde in 8 µl DEPC-Wasser verdünnt und anschließend mit 1 µl 10x DNaseI-Reaktionspuffer sowie 1 µl DNaseI (New England Biolabs; Ipswich, USA) versetzt. Der DNase-Verdau erfolgte für 10 min bei 37°C und wurde danach für 10 min bei 75°C abgestoppt. Die Proben wurden im Anschluss bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis inkubiert.

2.3.3.2. Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mittels SuperScript®II Reverse Transcriptase (Invitrogen/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden zum Ansatz des DNase-Verdau 4µl DEPC-Wasser hinzugegeben und dieser dann in je 2 Teile á 7 µl aufgeteilt. Der zweite Ansatz diente als NoRT-Kontrolle und wurde ohne Zugabe der Reversen Transkriptase inkubiert. Um einen vorzeitigen Abbau der RNA zu verhindern, wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Es erfolgte die Zugabe des in Tabelle 1 aufgeführten Reaktionsansatzes zu den Proben:

Tab. 1: Pipettierschema für den Reaktionsansatz zur Reversen Transkription

Reaktionsansatz (18 µl)	1x
5x First strand buffer	4 µl
DTT (100 mM)	0,25 µl
dNTPS (je 10 mM)	1 µl
RNase Out (40U/µl)	0,5 µl
Random Primer (1:10 verdünnt; 0,3µg/µl)	0,67 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O (Sigma)	11,33 µl

Die Reverse Transkription erfolge nach Zugabe des Reaktionsmixes im Thermocycler unter Anwendung des in Tabelle 2 erläuterten Programmes:

Tab. 2: Thermocycler-Programm der Reversen Transkription

Schritt	Temperatur	Inkubationszeit
1	25°C	5 min
2	42°C	30 min
3	95°C	5 min

2.3.3.3. RT² Profiler PCR Arrays

Eine Menge von 500 ng der RNA aus dem Herzen von EGFR-*Knock-out*- und -Wildtyp-Mäusen wurde pro Array in cDNA umgeschrieben und nach Angaben des Herstellers für die RT² Profiler PCR Arrays (Qiagen/SABiosciences; Hilden, Deutschland) eingesetzt. Verwendet wurden Arrays für neuronale Ionenkanäle der Maus, welche den kardialen Ionenkanälen größtenteils entsprechen. Insgesamt konnten pro Array 83 verschiedene Ionenkanäle analysiert und auf 5 Housekeeping-Gene bezogen werden. Weitere interne Kontrollen ermöglichten eine Aussage über die Qualität der RNA sowie der Reversen Transkription. Eine Auflistung aller analysierten Gene bzw. Ionenkanäle sowie der Kontrollen wurde in im Anhang A3 angefügt.

2.3.3.4. Realtime-PCR

Die durch Reverse Transkription entstandene cDNA wurde für Realtime-PCR-Analysen verwendet. Die Realtime-PCR erfolgte unter Verwendung des Platinum® SYBR® Green qPCR Super-Mix UDG-Kit (Invitrogen/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Proben sowie die entsprechenden NoRT-Kontrollen wurden zweifach bestimmt und nach folgendem Schema (Tab. 3) pipettiert:

Tab. 3: Pipettierschema einer Realtime-PCR

Realtime-PCR-Ansatz	1x
2x SuperMix	6,25 µl
Primer sense (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer antisense (10 pmol/µl)	0,5 µl
Template	2 µl
Rox	0,025 µl
Aqua	3,225 µl

Die für die Realtime-PCRs verwendeten Primer für die analysierten Gene sowie die PCR-Bedingungen sind im Anhang (A1.1 sowie A1.2) aufgelistet. Die qPCR-Analysen erfolgten serienweise entweder unter Verwendung des Stratagene MX3005P™ QPCR Gerätes (Stratagene/ Agilent Technologies; Santa Clara, CA, USA) oder mit dem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland). Die Auswertung erfolgte zunächst mit Hilfe der MxPro-Mx3005P- (Stratagene) bzw. SDS 2.3-Analysesoftware (Applied Biosystems) und wurde anschließend mit Excel oder SigmaPlot 12.0 statistisch ausgewertet.

2.3.4. Isolation von DNA

Die zu extrahierende DNA wurde mit dem adäquaten Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v) versetzt, für 10 sec mit einem Vortex gemischt und anschließend für 3 min bei RT bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die DNA befindet sich nach Phasentrennung in der oberen wässrigen Phase, welche abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wird.

2.3.5. Ethanol-Fällung (DNA)

Der gelösten DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) hinzugefügt. Durch darauffolgende Zugabe von 2,5 Volumenteilen 96%-igen eiskalten Ethanols und Inkubation bei -20° C für mindestens 1 h wurde die DNA ausgefällt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 4° C und 13 000 rpm und Waschen des entstandenen Pellets mit 75% Ethanol. Die Resuspension erfolgte in 25-50 µl Aqua.

2.3.6. Isolierung von Plasmiden

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mittels alkalischer Lyse und Silikasäulen unter Verwendung des Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kits (Invitex/ STRATEC Molecular; Berlin, Deutschland) nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Das Lösen der Plasmide erfolgte in 30 µl RNase- sowie DNase-freiem Wasser.

2.3.7. Oligohybridisierung

Die Herstellung kleiner DNA-Fragmente und biotinylierter DNA-Sonden erfolgte mittels Oligohybridisierung. Die für die Oligohybridisierung verwendeten Primer werden im Anhang A1.3 aufgelistet. Hierfür wurden die Reaktionsansätze nach dem in Tabelle 4 dargestellten Ansatz pipettiert und anschließend für 5 min bei 95°C im Thermocycler inkubiert und anschließend über mehrere Stunden auf RT abgekühlt. Im Anschluss daran wurden die Proben mittels Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt.

Tab. 4: Pipettierschema einer Oligohybridisierungsreaktion

NEB 3 Puffer (10x)	5 µl
Primer sense (100 pmol/µl)	5 µl
Primer antisense (100 pmol/µl)	5 µl
Aqua	35 µl

Die Herstellung längerer biotinylierter Sonden erfolgte durch PCR an Plasmiden, in die entsprechende Zielsequenzen kloniert waren. Die für die Biotin-PCR verwendeten Primer und die entsprechenden Anlagerungstemperaturen werden im Anhang A1.4 aufgelistet. Die PCR erfolgte mit Biotin-markiertem dUTP nach folgendem Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm (Tab. 5):

Tab. 5: Reaktionsansatz und -bedingungen einer Biotin-PCR

Reaktionsansatz	1 x	Thermocycler-Programm		
10 x PCR Puffer	5 µl	Schritt	Temperatur	Inkubationszeit
5 x Q-Solution	10 µl	1	94°C	3 min
Primer sense (10 pm/µl)	1 µl	2	94°C	30 sec
Primer antisense (10 pM/µl)	1 µl	3	...°C	30 sec
DNA-Template	1 µg	4	72°C	45 sec
dATP	1 µl	5	72°C	5 min
dGTP	1 µl			
dCTP	1 µl			
dTTP	0,6 µl			
dUTP	4 µl			
Taq-Polymerase	2,5 U			
Aqua	ad 50 µl			

} 40x

2.3.8. DNA-Gelelektrophorese

2.3.8.1. DNA-Fragmente größer 200 bp

Die Analyse von DNA erfolgte durch Elektrophorese in 0,8 - 2%igen Agarosegelen in einer horizontalen Gelkammer unter Verwendung von 0,5fachem TAE-Puffer (hergestellt aus einer 50x TAE-Stammlösung: 2 M TRIS; 1 mM Eisessig; 0,05 M EDTA). Die DNA-Proben wurden nach Verdünnung mit 6x Ladepuffer (10 mM Tris-HCL (pH 7.6), 0.03 % Bromphenolblau, 0.03 % Xylencyanol, 60 % Glycerin und 60 mM EDTA) in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Leiter Mix (Range 100-10000 bp; peqlab; Erlangen) verwendet. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 10 V/cm Gel angelegt. Die Detektion erfolgte nach 20 minütiger Inkubation in einer verdünnten Ethidiumbromidlösung (1000x Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,5 mg/ml), gefolgt von einem 30 minütigen Waschschrift in destilliertem Wasser, im UVP-Transilluminator BioDoc-It™ Imaging System (UVP/ Analytik Jena AG; Jena, Deutschland).

2.3.8.2. DNA-Fragmente kleiner 200 bp

DNA-Fragmente mit einer Länge ≤ 200 bp wurden in 10-14%igen Polyacrylamidgelen (Zusammensetzung siehe Tab. 6) in einer vertikalen Gelkammer unter Verwendung von 1x TBE-Puffer (hergestellt aus einer 10x TBE-Stammlösung: 108 g TrisBase; 55 g Borsäure; 7,5 g EDTA ad 1 l Aqua) analysiert. Die Verdünnung der DNA-Proben erfolgte analog mittels 6x Ladebuffer. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde eine Ultra Low Range DNA-Leiter (Range: 10-300 bp; PEQlab; Erlangen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 140V für 45-60 min. Die Detektion erfolgte nach 10 minütiger Inkubation in verdünnter Ethidiumbromidlösung und anschließendem 20 minütigen Waschen in destilliertem Wasser im UVP-Transilluminator BioDoc-It™ Imaging System (UVP/ Analytik Jena AG; Jena, Deutschland).

Tab. 6: Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele

	10%	12%	14%
1x TBE-Puffer	6 ml	5,6 ml	5,2 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2 ml	2,4 ml	2,8 ml
Ammoniumpersulfat (APS)	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 μ l	10 μ l	10 μ l

2.3.9. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten zur Herstellung von Plasmiden oder die Aufreinigung von Biotin-markierten DNA-Sonden erfolgte nach Auftrennung der entsprechenden Proben in 0,8-2%igen Agarose- oder 10-14%igen Polyacrylamid-Gelen. Hierfür wurde die DNA durch Anfärben mit Ethidiumbromid und Nachweis auf einem Transilluminator (Biometra; Göttingen, Deutschland) mit UV-Licht bei 355 nm sichtbar gemacht und die Banden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung aus Agarosegelen wurde mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. DNA-Fragmente aus Polyacrylamidgelen wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und über Nacht bei RT im Schüttelinkubator in 200 μ l Elutionspuffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA [pH 8], 50 mM NaCl) inkubiert. Nach Pelletieren der Gelfragmente wurde der Überstand in ein neues Eppi überführt und im Anschluss die DNA mit 1/10 Vol 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol 100%igem eiskalten Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Eine 20 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C sowie das Waschen des entstandenen Pellets mit 70%igem eiskalten Ethanol für 15 min bei 13000 rpm und 4°C folgten. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und zuletzt in 25 μ l DNase freiem Wasser gelöst.

2.3.10. Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit dem NanoVue Spectrophotometer (GE Health Care Europe; Freiburg, Deutschland) bei 260 nm Konversionsfaktor für Absorption 1,0 = 50 µg/ml für DNA

2.3.11. Klonierung

2.3.11.1. Restriktion von DNA-Fragmenten

Die Restriktionen der Plasmide und DNA-Fragmente erfolgten unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs (Ipswich, USA) und ihrer entsprechenden vom Hersteller empfohlenen und dazu gelieferten 10x NEB-Puffer.

2.3.11.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden

Klonierungen, bei denen sowohl der Vektor als auch das Insert am 5'-und 3'-Ende jeweils identische Schnittstellen aufwiesen, erforderten die Dephosphorylierungen des Vektors vor der Ligation, um zu verhindern, dass sich der Vektor ohne Insertion des DNA-Fragments schließt. Hierfür wurde der Vektor für 40 min bei 37°C mit CIP (Calf Intestine Phosphatase; NEB, Ipswich, USA) nach Hitzeinaktivierung der Reaktionsenzyme im Reaktionsansatz inkubiert und anschließend über ein Agarosegel und darauf folgende Gelextraktion aufgereinigt.

2.3.11.3. PCR

PCR-Reaktionen wurden mit einem Taq PCR Kit (Qiagen; Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Ansatz wurde nach dem in Tabelle 7 dargestellten Schema pipettiert bzw. für ein Gesamtvolumen von 25 µl angepasst.

Tab. 7: Pipettierschema einer Standard-PCR-Reaktion

Reaktionsansatz	Endkonzentration
10x PCR Buffer	1x
dNTP (je 10 mM)	jeweils 200 µM
Primer sense (10 pmol/µl)	0,1-0,5 µM
Primer antisense (10 pmol/µl)	0,1-0,5 µM
Taq-Polymerase	2,5 U
Template	100 ng - 1µg
Aqua	ad 50 µl/ 25 µl

2.3.11.4. Herstellung von Plasmiden

Tab. 8: Zusammenfassung der hergestellten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Verwendung
pSEAP-MRE1.3	Expressionsvektor Sekretorische Alkalische Phosphatase (SEAP) als Reporter Fragmente upstream des SEAP-Gens SV40-Polyadenylierungs-signal Ampicillin-Resistenz; Transkriptionsblocker	Reporter-gen-Assays
pSEAP-MRE1.4		
pSEAP-MRE1.3mut1		
pSEAP-MRE1.3mut2		
pSEAP-MRE1.3d		
pSEAP-MRE1.3e		
pSEAP-MRE1.3f		
pSEAP-MRE1.3mut1 Δ		
pSEAP-MRE1.3SNP1		
pSEAP-MRE1.3SNP2		
pEGFP-SP1	Binärvektor SP1-Gen befindet sich downstream des EGFP-Gens SV40-Polyadenylierungs-signal SV40-Promotor Neomycin-/ Kanamycin-Resistenz	Lokalisierung von SP1

In allen Klonierungsexperimenten, in denen PCR-Fragmente kloniert wurden, diente das Plasmid pCR2.1 des TA Cloning Kits als Zwischenvektor für die Integration der DNA-Fragmente. Ausgehend von den TA-Plasmiden erfolgte die Herstellung der verschiedenen Expressionsvektoren, welche im Anschluss für die Reporter-gen-Assays und proteinbiochemischen Analysen verwendet wurden. Die Vektorkarten der verwendeten Plasmide können im Anhang A2.2 eingesehen werden.

Klonierung verschiedener EGFR-Promotorelemente in pSEAP2-Basic

Das pSEAP-MRE1-Plasmid enthält eine 153 bp -Teilsequenz (von -316 bis -163 bp) des insgesamt 1118 bp großen EGFR-Promotors. Folglich wird die *downstream* des EGFR-Promotors liegende Sekretorische Alkalische Phosphatase bei Aktivierung des Promotors exprimiert. Für die Untersuchung kürzerer oder mutierter Promotorstücke wurden Fragmente des Promotors mittels PCR hergestellt und anschließend in den aufgeschnittenen pSEAP2-Basic-Vektor kloniert. Die im Anhang A1.5 aufgeführten Primer wurden zur Herstellung der PCR-Fragmente verwendet, welche danach in den pCR2.1-Vektor eingefügt und in ONE SHOT® Top Ten - kompetente Bakterien (Invitrogen/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) transformiert. Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden Bakterienklone mit Insert identifiziert, und aus diesen Plasmide gewonnen sowie durch Restriktion charakterisiert. Im Anschluss daran wurden die Inserts mit den im Anhang A1.5 und A1.6. angegebenen Restriktionsenzymen exzidiert und in den ebenfalls mit diesen Enzymen aufgeschnittenen pSEAP2-Basic-Vektor eingefügt. Weiterhin wurden kürzere Fragmente mittels Oligohybridisierung (siehe 2.3.7.) hergestellt, in den Vektor pCR2.1 zwischenkloniert und

darauf folgend in den pSEAP2-Basic-Vektor umkloniert. Die im Anhang A1.6 aufgelisteten Oligonukleotide wurden hierfür verwendet:

Herstellung des pEGFP-SP1

Die Markierung des humanen Transkriptionsfaktors SP1 (Specificity Protein 1) mit EGFP wurde durch Klonierung in pEGFP-C1 (Clontech; Mountain View, USA) erreicht. Hierfür wurde zunächst RNA aus HEK293-Zellen isoliert und diese dann mittels RT-ONE STEP PCR (Invitrogen/ Life Technologies; Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers mittels spezifischer Primer in cDNA umgeschrieben. Die für die PCR verwendeten Primer, die verwendeten Restriktionsschnittstellen sowie der spezifische Reaktionsansatz werden in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Pipettierschema der RT-ONE STEP PCR inklusive der verwendeten Primer

Gen	Primer	Oligo (5'- 3')	Restriktionsschnittstellen
SP1	SP1 sense	5'GGTACCATGAGCGACCAAGATCACTCCAT3'	beide EcoRI
	SP1 anti	5'GAATTCTCAGAAGCCATTGCCACTGATA3'	
Reaktionsansatz		Volumen/ Menge	
Template		0,5 µg	
2x Reaktions-Mix		12,5 µl	
Primer (sense + anti)		je 1,0 µl	
RT/ Platinum Taq Mix		0,5 µl	
Aqua dest		ad 25 µl	

Die Synthese der cDNA sowie die Herstellung des Sp1-Fragmentes mittels PCR erfolgten im Thermocycler unter Verwendung des dargestellten Programmes.



Nach anschließender Gelelektrophorese im 1%-igen Agarosegel wurde das PCR-Fragment ausgeschnitten, aufgereinigt und unter Verwendung des TA Cloning Kits in pCR2.1 kloniert.

Nach Blau-Weiß-Selektion wurde das Insert mittels EcoRI-Restriktion aus dem Zwischenvektor exzidiert und in den mittels EcoRI aufgeschnittenen und aufgereinigten pEGFP-C1-Vektor, welcher vorher nach 20 minütiger Deaktivierung des Restriktionsenzym bei 65°C unter Verwendung der Calf Intestine Phosphatase (CIP, NEB; Ipswich, USA) für 60 min bei 37°C dephosphoryliert wurde, ligiert. Nach Transformation in kompetente ONE SHOT® Top Ten - Bakterien und Kanamycin-Selektion wurden die Plasmide isoliert und mittels EcoRI-Testrestriktion auf das Vorhandensein des Inserts kontrolliert. Zur Überprüfung des Inserts erfolgte die Sequenzierung positiver Klone.

2.3.11.5. Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden kommerziell durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Isolation von Proteinen

Die Isolation der Proteine erfolgte nach dreimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS (10x PBS: 80 g/l NaCl; 2 g/l KCl; 14,42 g/l Na₂HPO₄; 2 g/l KH₂PO₄) und anschließendem Abkratzen in Pelletpuffer (PBS mit 184 mg/l Natriumorthovanadat, 1 mM EDTA und 1:1000 Proteasen-Inhibitor-Cocktail-Set III, Calbiochem/ Merck Millipore; Darmstadt, Deutschland). Danach wurde bei 2000 g für 15 min zentrifugiert, das Pellet in entsprechendem Lysepuffer aufgenommen und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann bei 4° C und 6000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand in den folgenden Experimenten verwendet. Die verwendeten Lysepuffer sowie deren Zusammensetzung wurden in Tabelle 10 aufgelistet.

Tab. 10: Zusammensetzung der verwendeten Lysepuffer

Puffer	Zusammensetzung
RIPA Puffer (Radio Immunoprecipitation Assay Buffer)	50 mM Tris-HCl pH 7,4); 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 2,4 mM EDTA; 1/1000 Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem)
CST Puffer (Cell Signaling Technology Buffer)	20mM Tris-HCl (pH 7,5); 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Triton X-100; 2.5mM Natriumpyrophosphat; 1mM Na ₃ VO ₄

Vor dem Auftragen der Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Lysate mit Laemmli Puffer versetzt und für 10 min bei 95°C in einem Heizblock denaturiert.

2.4.2. Isolation nukleärer Proteine

Für die *Electromobility Shift Assays* (EMSA) und Transkriptionsfaktor-ELISAs wurden nukleäre Proteinextrakte isoliert und mit den entsprechenden Sonden inkubiert. HEK293-Zellen wurden transient mit pEGFP-MR oder pEGFP-GR transfiziert und nach 24h mit 10nM Aldosteron- oder 1 µM Hydrocortison-haltigem Medium stimuliert. Nach weiteren 24 h erfolgte die Herstellung der Zellkernextrakte aus 100 x 20 mm Petrischalen nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem 1x PBS (137 mM NaCl, 12 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4) und anschließendem Aufnehmen der Zellen in 1 ml 1x PBS mit 1/1000 Protease-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem/ Merck Millipore; Darmstadt, Deutschland). Die Isolierung der Zellkernextrakte erfolgte mit Hilfe des Nuclear Extraction Kits der Firma Active Motif (Rixensart, Belgien) nach Angaben des Herstellers. Hierbei verhindern Phosphatase-Inhibitoren zunächst weitere Modifikationen der Proteine z.B. durch Proteolyse. Anschließend bewirkt die Inkubation mit einem hypertonischen Puffer die Schwellung der Zellen und daraus resultierend das Aufbrechen der Plasmamembran. Eine Zugabe von Detergens führt zum Austritt der zytoplasmatischen Proteinfraction, welche als Überstand entfernt werden kann, bevor die Lyse der Zellkerne angeschlossen wird. Das Entsalzen der nukleären Proteine erfolgte mittels Amicon Ultra-4, PLGC Ultracel-PL Membrane (10 kDa)-Säulchen (Merck Millipore; Billerica, USA) nach Angaben des Herstellers.

2.4.3. Bestimmung des Proteingehaltes

In Abhängigkeit des Experimentes und der im Lysepuffer vorhandenen Zusatzstoffe wurden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Proteingehaltes verwendet.

2.4.3.1. Bicinchinonsäure Assay (BCA)

Die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode wurde vorwiegend angewendet. Hierbei reduzieren die Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} - Ionen zu Cu^{+} - Ionen, die so mit Bicinchinonsäure einen violetten Farbkomplex bilden. Hierfür wurde BCA-Reagenz (Pierce/ Thermo Fisher Scientific; Rockford, USA) mit 4%-iger Kupfersulfat-Lösung gemischt (50:1). Für die Messung wurden 2-15 µl der Probe mit 200 µl Reaktionsgemisch für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit einem Sunrise™ Multiwell Counter (TECAN, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Eine BSA-Eichkurve (c = 0, 100, 300, 500, 700 und 1000 mg/l) wurde für jede Messung mitgeführt.

2.4.3.2. Bestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes nukleärer Zellkernextrakte wurde alternativ die Methode nach Bradford verwendet. Hierbei bindet Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurem Milieu an Proteine, wodurch sich dessen Absorptionsspektrum von 465 nach 595 nm verschiebt. Zur Quantifizierung wurde Bradford-Reagenz der Firma BIO-RAD (Hercules, USA) 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend 200 µl des verdünnten Reagenz auf 2 µl der zu analysierenden Probe oder 15 µl der BSA-Standardlösungen (c= 0, 100, 300, 500, 700 und 1000 mg/l) gegeben. Die Messung der Extinktion bei 590 nm erfolgte sofort nach Zugabe mit einem TECAN infinite M200 Multiwell Counter (TECAN, Männedorf, Schweiz).

2.4.4. Western Blot

2.4.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Eine Auftrennung der mit Laemmli Puffer gemischten und für 10 min bei 95°C erhitzten Zelllysate erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Proteine wurden hierbei entsprechend ihres spezifischen Molekulargewichtes auf 10-12%-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde in 1x Laufpuffer (25 mM Tris; 3,5 mM SDS; 192 mM Glycin) durchgeführt.

2.4.4.2. Western Blot

Nach erfolgter SDS-Page wurden die Proteine mittels Semi-dry-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran in 1x Transferpuffer (20% MeOH; 25 mM Tris, 192 mM Glycin) transferiert. Im Anschluss wurde die Nitrozellulose-Membran für 1-2 h in 5% Blocking Puffer (5% Milchpulver; 1x TBS; 0,1% Tween20) inkubiert, 3 mal 5 min in 1x TBS/Tween20 (50 mM Tris.HCl, pH 7.4 and 150 mM NaCl, 0,1% Tween20) gewaschen und mit dem jeweiligen spezifischen Erstantikörper über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler in Antikörperverdünnungslösung (1x TBS; 0.1% Tween-20, 5% BSA) inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3 mal für 5 min in 1x TBS/Tween20 gewaschen und darauffolgend mit dem entsprechenden Zweitantikörper in 5% Blocking Puffer für 2 h bei RT inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen für 5 min in 1x TBS (50 mM Tris.HCl, pH 7.4 and 150 mM NaCl) und einmaligem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz mit dem Chemiluminescence reagent for Horseradish Peroxidase (SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg, Deutschland) oder Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD; Hercules, USA) nach Angaben des Herstellers in einem Molecular Imager® ChemiDoc™ XR- System von BIO-RAD (Hercules, USA). Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe der Quantity One 1-D Analysis Software (BIO-RAD; Hercules, USA) durchgeführt. Die für die Western Blot Analysen verwendeten Antikörper sowie deren Herstellung und die verwendeten Verdünnungen wurden in Tabelle 11 und 12 aufgelistet.

Tab. 11: Liste der verwendeten Erstantikörper

Erstantikörper	Verdünnung	Firma	Organismus
Anti-SP1; Kaninchen, polyklonal; (ab59267)	1:1000	Abcam	Mensch (Maus, Ratte)
Anti-Sp3; Kaninchen, polyklonal; (# 07-107)	1:1000	Millipore (upstate)	Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen
EGF Receptor Antibody; Kaninchen, polyklonal; (# 2232)	1:500	Cell Signaling	Mensch, Maus, Ratte
HSP90α/β (H-114); Kaninchen, polyklonal; (sc-7947)	1:2000	Santa Cruz Biotechnology	Mensch
β-Actin (13E5); Kaninchen, monoklonal; (# 4970)	1:2000	Cell Signaling	Mensch, Maus, Ratte,

Tab. 12: Auflistung der verwendeten Zweitantikörper

Zweitantikörper (HRP-gekoppelt)	Verdünnung	Firma
Anti-Rabbit IgG Antibody Peroxidase Conjugated ; goat (611-1302)	1:20000	Rockland
Anti-rabbit IgG; HRP-linked Antibody; goat (# 7074)	1:2000	Cell Signaling
Anti-mouse IgG; HRP-linked Antibody; goat (# 7076)	1:2000	Cell Signaling

2.4.5. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Lokalisierung EGFP- oder RFP-markierter Proteine wurden HEK293-Zellen mit Hilfe von konditioniertem Medium auf Glasträgern (ibidi; Martinsried, Deutschland) angesät und mit EGFP-SP1 und RFP-MR nach Angaben des Herstellers mit Polyfect Reagenz (Qiagen, Hilden, Deutschland) transfiziert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Stage Top Incubator INU-KI-F1-Inkubationssystems für Mikroskope (Tokai Hit, Fujinomiya, Japan), welches Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Gehalt kontrolliert und konstant halten kann sowie einem Keyence BZ-8100E-Fluoreszenzmikroskop (Keyence Corporation, Osaka, Japan) bei 40-facher bzw. 100-facher Vergrößerung. Zunächst wurden die Fluoreszenzmarkierten Proteine mittels integrierter Kamera lokalisiert, fotografiert und anschließend in das Zellmedium 10 nM Aldosteron appliziert. Im Folgenden wurde ein Zeitverlauf mit 20 Bildern (je ein Bild nach 1 min) und dementsprechend die Lokalisierung der Proteine dokumentiert.

2.5. Methoden zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen

2.5.1. Electromobility Shift Assay (EMSA)

Die Analyse der Interaktionen zwischen den verschiedenen EGFR-Promotor-Sequenzen und den Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 erfolgte mittels Electromobility Shift Assay. Hierfür wurden biotinylierte Sonden durch Oligohybridisierung oder PCR mit biotinylierten dUTPs hergestellt. Die Bindung der DNA an das Protein erfolgte mit Hilfe des LightShift Chemiluminescence EMSA Kit (Thermo Fisher Scientific; Bonn, Deutschland) für 30 min bei RT unter Verwendung von einem Reaktionsgemisch aus 10 nM Tris; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 5% Glycerol und 1 mg/ml poly(dI-dC). Die biotinylierten Sonden wurden in einer Endkonzentration von 5 fmol pro Ansatz eingesetzt und mit 300 ng des humanen rekombinanten SP1 (rhSP1) (Promega; Mannheim, Deutschland), 100 ng des humanen rekombinanten SP3 (rhSP3) (Abnova; Teipeh, Taiwan), 50 µg Zellkernextrakt oder BSA (c = 300 oder 100 ng) als Negativkontrolle inkubiert. Die Gelelektrophorese der DNA-Protein-Komplexe erfolgte entsprechend der Größe der Komplexe in 10%-igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen in 1x TBE-Laufpuffer (89 mM Tris; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH(10xTBE)=8) bei 140V für 1-2 h. Im Anschluss wurden die Proben auf eine Nylonmembran bei 250 mA für 45 min transferiert und darauffolgend für 1 min bei 120 mJ/cm² mit der Membran vernetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (Thermo Fisher Scientific; Bonn, Deutschland) oder dem Gelshift Chemiluminescent EMSA Assay Kit (Active Motif; Rixensart, Belgien) nach Angaben der Hersteller. Die vom Hersteller empfohlenen Waschschriffe wurden hierbei auf 4 x 15 min verlängert. Die Aufnahme erfolgte in einem Molecular Imager® ChemiDoc™ XR- System von BIO-RAD (Hercules, USA).

2.5.2. Transkriptionsfaktor-ELISA

Zur Herstellung von in vitro-MR, -GR und -LacZ (Negativkontrolle) wurde das TNT®T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega; Mannheim, Deutschland) verwendet, um die Vektoren pCDNA3.1HisC-hMR, pCDNA3.1His-GR oder pCDNA3.1His-LacZ in die jeweiligen in vitro Proteine zu translatieren. Biotinylierte DNA-Sonden wurden in Straptavidin-beschichteten Platten immobilisiert. Wells mit den entsprechenden Sonden wurden in Blocking Puffer (5 % BSA in PBS/Tween 0,05%) für 1 h bei RT entweder mit in vitro hMR oder nukleären Extrakten inkubiert und anschließend in drei Waschschriffen (0,05% Tween20 in 1x PBS) entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einer 1:2000-Verdünnung des anti-XPRESS Antikörpers (Invitrogen/Life Technologies; Darmstadt, Deutschland), einer 1:500-Verdünnung des anti-GR Antikörpers (Active Motif, Rixensart, Belgien) oder einer 1:200-Verdünnung des anti-rMR1-18 1D5 (Gomez-Sanchez, [192]) für ca. 2 h bei RT. Nach drei weiteren Waschschriffen wurde der HRP-gekoppelte (Horseradish

Peroxidase) sekundäre Antikörper in einer 1:2000-Verdünnung hinzugefügt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-Substrat (0,5 mg/ml o-Phenylenediamin, 11,8 mg/ml Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 7,3 mg/ml Zitronensäure und 0,015% H₂O₂) und im Anschluss die kolorimetrische Detektion bei 490 nm in einem Sunrise™ Multiwell Counter (TECAN, Männedorf, Schweiz).

2.6. Bioinformatik

Die *in silico* Suche nach Bindestellen für Transkriptionsfaktoren auf dem EGFR-Promotor erfolgte mit Hilfe des Programmes AliBaba2.1 (Webseite: <http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>).

Die genomweite Suche nach Promotorelementen, die MRE1.3 ähneln oder Infixe der Sequenz darstellen erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ivo Grosse aus dem Institut für Bioinformatik (MLU Halle-Wittenberg) und wurde freundlicherweise von Dr. Jens Keilwagen durchgeführt. Dieser analysierte die Ähnlichkeit anhand optimaler semi-globaler Alignments zwischen allen humanen Promotoren und drei ausgewählten Sequenzbereichen des MRE1.3-Promotorelements. Die Suche erfolgte anhand optimaler semi-globaler Alignments mit einer dynamischen Programmierung (gewählte Parameter: match score -1, mismatch score +2, gap opening cost +2 sowie gap elongation cost +1) mit der jstacs-Software (www.jstacs.de).

Desweiteren wurden die in Tabelle 13 aufgelisteten Programme und Datenbanken verwendet:

Tab. 13: Verwendete Datenbanken und Programme

Name	Funktion	Webseite
NCBI	Sequenzanalyse, Geninformationen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
ENSEMBL Genome Browser	Sequenzanalyse, Geninformationen	http://www.ensembl.org/index.html
RT ² Profiler PCR Array Data analysis	Web-basierte Analyse der PCR-Arrays	http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAMM-036Z.html
Webcutter 2.0	Suche nach Restriktionsschnittstellen	http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/
Primer 3	Ableiten von Primern	http://primer3.ut.ee/
Primer BLAST	Ableiten von Primern	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
PrimerBank	Suche von qPCR-Primern	http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/
Reverse Complement	Umkehren von Sequenzen	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
NCBI BLAST	Sequenzanalyse	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW2	Multiple Sequenzvergleiche	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
dbSNP	SNP-Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
Pubmed	Literaturrecherche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/

2.7. Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tab.n-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel und der Statistik- und Graphik-Software SigmaPlot 12.0. Dargestellt werden die gemessenen Daten als arithmetischer Mittelwert plus Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Im Vergleich zweier Gruppen wurde die statistische Signifikanz mittels Students-t-Test oder mit Hilfe von Konfidenzintervallen ermittelt. Als statistisch signifikant galten Werte von $p \leq 0,05$. Diese wurden infolgedessen mit einem „*“ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Interaktion zwischen MR und EGFR-Promotor

3.1.1. Identifizierung des Mineralokortikoid-responsiven Elements des EGFR-Promotors

In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurde eine Steigerung der EGFR-Expression durch Aktivierung des MR sowohl im Tiermodell als auch in Primärzellen und Zellkulturen beschrieben. Da eine Aktivierung des GR hierbei keinen Einfluss zeigte, wurde der EGFR als MR-spezifisch reguliertes Gen identifiziert [156]. Mittels CHIP-Analyse und Promotor-Reporter-Gen-Assays konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der aktivierte MR die EGFR-Expression über eine vermehrte Promotoraktivität steigert [156]. Weiterhin erfolgte auf dem EGFR-Promotor in der Region -316 bis -163 die Eingrenzung eines Bereiches, MRE1, der durch den Aldosteron-stimulierten MR aktiviert wird [156,193] und im Folgenden näher charakterisiert werden soll.

Zur weiteren Eingrenzung der für die Interaktion mit dem MR notwendigen Regionen wurde dieser Bereich in Fragmente unterteilt und die verschiedenen Konstrukte des Promotors in den pSEAP2-basic Reporter-Gen-Vektor kloniert (Abb. 8/A). Die Analyse dieser Promotorelemente hinsichtlich ihrer Aldosteron-abhängigen Aktivierbarkeit erfolgte anschließend in Reporter-Gen-Assays in transient MR-transfizierten HEK293-Zellen. Eine Inkubation der Zellen für weitere 48 h mit DMSO als Kontrolle oder 10 nM Aldosteron wurde 24 h nach der Transfektion angeschlossen. Das Vollängenkonstrukt des MRE1 konnte nach Stimulation mit Aldosteron im Vergleich zur Inkubation mit DMSO 5-fach induziert werden. Sowohl MRE1.2 als auch MRE1.3 erzielten eine 4-fache Aldosteron-abhängige Induzierbarkeit des Reporters, wohingegen MRE1.1 und ein kürzeres Promotorelement (MRE1.4), ähnlich dem Leervektor, nur ca. 2-fach zu stimulieren waren. Als Negativ-Kontrolle diente der Leervektor pSEAP2-basic (Abb. 8/B). Da das 65 bp lange MRE1.3-Promotorelement als das kürzeste Konstrukt bei größtmöglicher MR/Aldosteron-induzierter Aktivierbarkeit identifiziert wurde, erfolgten die Analysen zur Charakterisierung der Interaktion von MR und EGFR-Promotor im Folgenden anhand des MRE1.3-Elements.

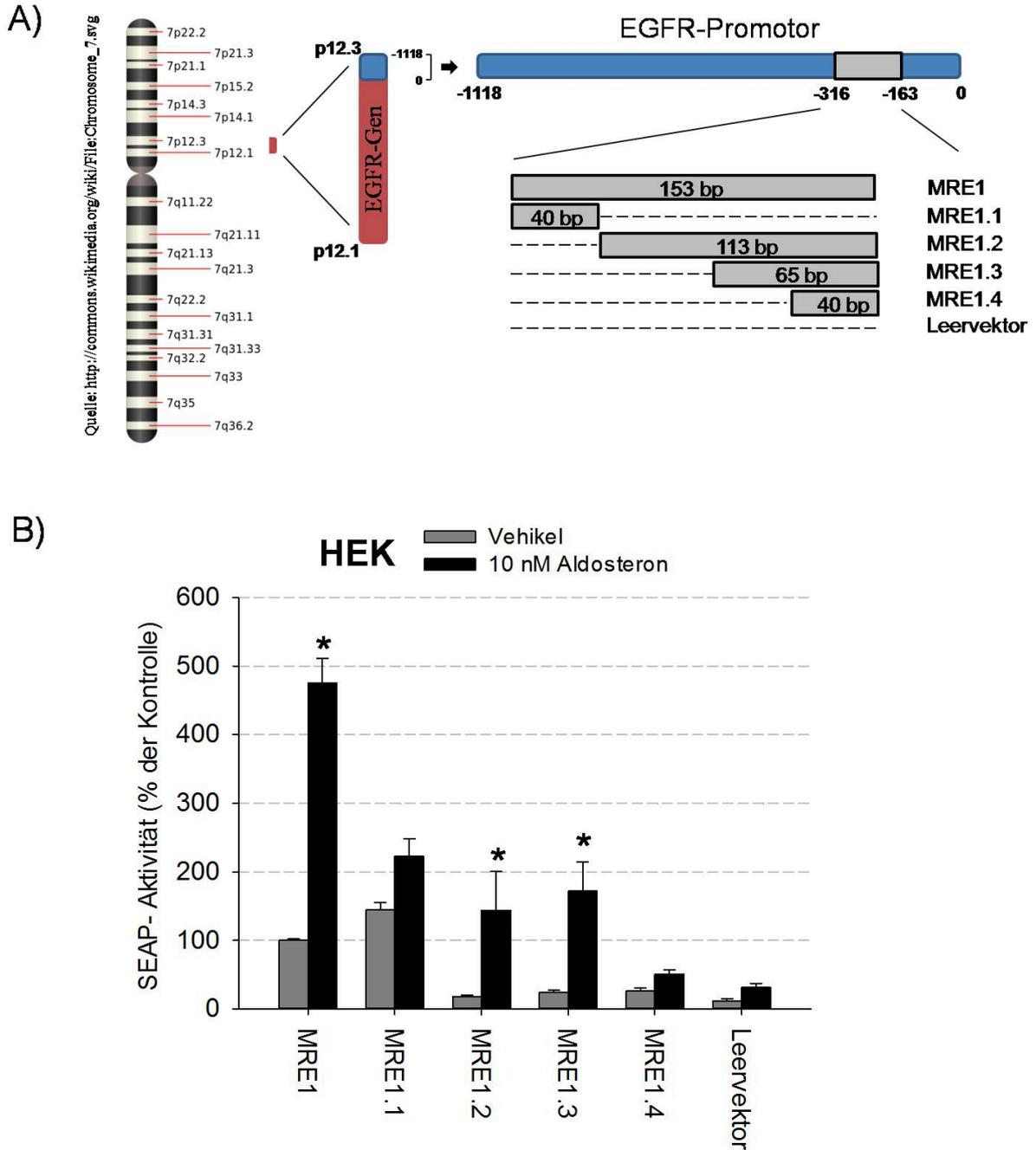


Abb. 8: Eingrenzung des Mineralokortikoid-responsiven Elements auf dem EGFR-Promotor. A) Schematische Darstellung des EGFR-Locus auf dem Chromosom 7 sowie der verschiedenen für die Eingrenzung des minimalen MRE verwendeten EGFR-Promotorkonstrukte in der Region -316 bis -163. B) SEAP-Reporter-Gen-Assays in HEK293-Zellen zeigen, dass das 65 bp lange Element (MRE1.3) die minimale Sequenzlänge aufweist, welche für die MR-vermittelte Aktivierung des EGFR-Promotors nach Stimulation mit Aldosteron notwendig ist. Kürzere Deletionskonstrukte zeigen keine signifikante Aktivierung (N= 3–18, n= 9–45, Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

3.1.2. Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 für die MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors

3.1.2.1. Bindung von MRE1 an in vitro-MR sowie MR aus Zellkernextrakten

Um die Bindung des MR an das EGFR-Promotorelement zu untersuchen, wurden Transkriptionsfaktor-ELISAs mit biotinylierter MRE1-Sonde sowie in vitro hergestelltem humanen MR oder MR aus Zellkernextrakten durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten zum einen der humane GR aus Zellkernextrakten, was die Spezifität der MRE1-MR-Bindung belegen sollte, und zum anderen Reaktionsansätze, die entweder ohne Sonde oder ohne Protein inkubiert wurden. In nukleären Extrakten aus mit 10 nM Aldosteron inkubierten HEK293-Zellen, zeigt der MR verglichen mit unstimulierten Zellen eine um das 2,5-fach stärkere Bindung an das MRE1-Promotorelement. Im Gegensatz dazu bewirkt die Inkubation von HEK293-Zellen mit 1 μ M Hydrocortison keine Steigerung der Bindungsaffinität des GR an MRE1 (Abb. 9/A). Unter Verwendung von in vitro hergestelltem MR konnte im Gegensatz zum MR aus Zellkernextrakten mit Aldosteron keine spezifische Bindung an das MRE1-Promotorelement nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle für eine hochaffine Bindung diente eine biotinylierte Sonde des Glukokortikoid-responsiven Elements (GRE) (Abb. 9/B). Die Unterschiede in der Bindung von MRE1 an den MR aus Zellkernextrakten und in vitro synthetisiertem MR legen nahe, dass für die Bindung des MR an das EGFR-Promotorelement weitere Kofaktoren notwendig sind, welche die Bindung unterstützen bzw. vermitteln.

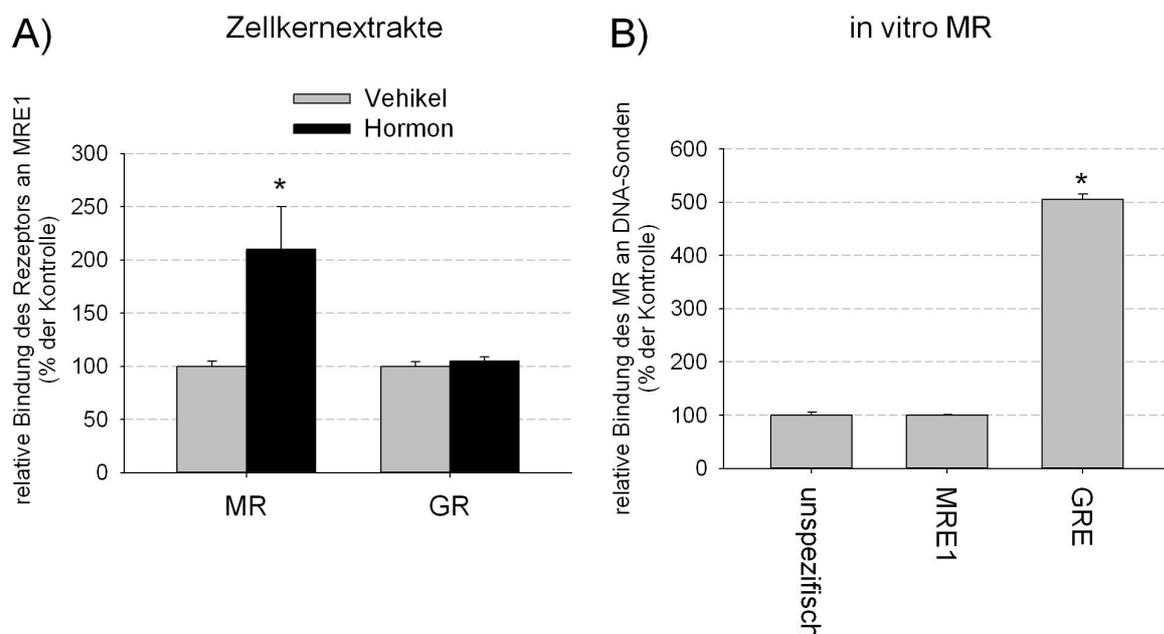


Abb. 9: MR-Bindung an MRE1. A) Aldosteron bewirkt im Vergleich zur Kontrolle eine stärkere Bindung des MR an MRE1. Hydrocortison zeigt keinen Einfluss auf die GR-Bindung. B) In vitro MR allein zeigt eine starke Bindung an GRE, jedoch keine spezifische MRE1-Bindung (N=1-3, n=4-11, Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM, * $p < 0.05$).

verschiedenen Varianten innerhalb der Binderegion. Abbildung 12/A stellt die für die EMSAs verwendeten biotinylierten Sonden, die annotierte SP1-Binderegion sowie die eingefügten Punktmutationen (MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2) dar. Die Bindung der SP1-Konsensussequenz sowie der MRE1.3-Sonde an SP1 aus nukleären Extrakten konnte anhand einer spezifischen Bande nachgewiesen werden (Abb. 12/B). Verwendet man die durch Punktmutation modifizierten Promotorelemente MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2, so lässt sich nach Inkubation mit den Zellkernextrakten keine spezifische Bande detektieren (Abb. 12/B). Somit konnte gezeigt werden, dass die spezifische Bindung von SP1 an das Mineralokortikoid-responsive Element nach Veränderung des Bindemotivs nicht mehr erfolgen kann.

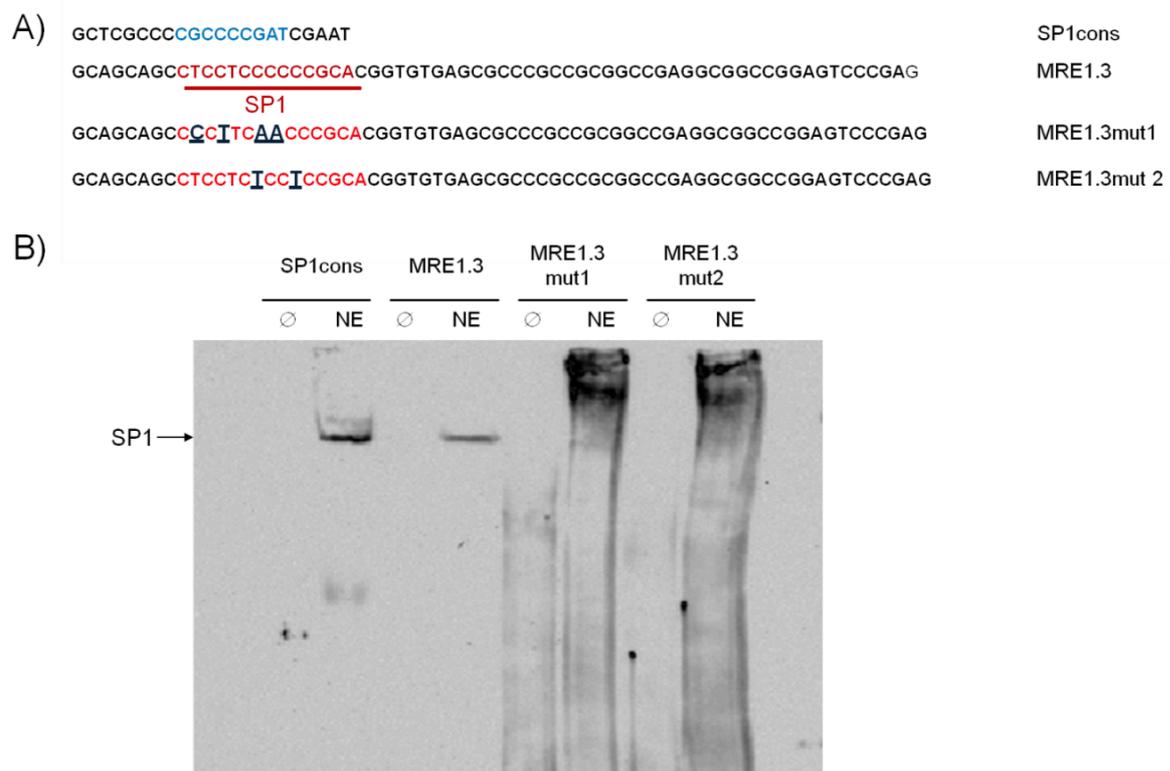


Abb. 12: Bindung von MRE1.3, MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2 an SP1 aus nukleären Extrakten. A) Dargestellt werden die biotinylierten Sonden sowie die annotierten SP1-Bindemotive (hellblau/rot) inklusive der eingefügten Punktmutationen (dunkelblau). B) EMSAs zeigen die spezifische Bindung von SP1cons und MRE1.3 an SP1 aus Zellkernextrakten. Im Gegensatz dazu binden MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2 nicht spezifisch an SP1. Alle Sonden wurden entweder ohne Protein (∅) oder mit 50 µg Gesamtprotein aus Zellkernextrakten (NE) inkubiert (N=3).

3.1.2.4. Mutationen innerhalb der MRE1.3-SP1-Bindestelle sowie Eingrenzung des EGFR-Minimalpromotors

Die Relevanz der SP1-Binderegion innerhalb des MRE1.3 für die Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors wurde mittels Reporter-Gen-Assays mit der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) in hMR-transienten Zellen untersucht (Abb. 13). Um zellspezifische Effekte auszuschließen, erfolgten die Experimente unter Verwendung von OK-Zellen, die mit den in Abb. 13/A dargestellten Promotorkonstrukten transfiziert und im Anschluss nach 24 h mit 10 nM Aldosteron oder DMSO für weitere 48 h inkubiert wurden. Während für das Vollängenkonstrukt MRE1.3 nach Aktivierung des MR durch Aldosteron eine ca. 25-fache Steigerung der Reporter-Gen-Aktivität im Vergleich zur Basalaktivität mit DMSO nachgewiesen werden konnte, zeigten die Promotorelemente MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2 lediglich eine 5- bzw. 6-fache Steigerung der Reporter-Gen-Aktivität nach Stimulation mit dem Liganden (Abb. 13/B). Im Vergleich zu den Resultaten unter Verwendung des MRE1.3-Konstruktes sind die Effekte sehr stark reduziert. Dies verdeutlicht die Bedeutung der SP1-Bindung an das Promotorelement für die MR-abhängige Aktivierung des EGFR-Promotors.

Das MRE1.3-Fragment wurde weiterhin hinsichtlich der Länge eines Minimalpromotors untersucht. Reporter-Gen-Assays mit den in Abbildung 13/A dargestellten Deletionskonstrukten zeigten, dass lediglich das komplette 65 bp lange MRE1.3 in Abhängigkeit des Liganden-gebundenen MR aktiviert werden konnte. Kürzere Promotorelemente wie MRE1.3d, -e und -f zeigten trotz Vorhandensein der SP1-Binderegion nach Stimulation mit Aldosteron keine Reporter-Gen-Aktivität. Auch die Deletion des mittleren Sequenzbereiches, wie im Konstrukt MRE1.3 Δ , führte dazu, dass die Expression und somit Aktivierung des Reportergens nach Inkubation mit Aldosteron nicht erfolgte (Abb. 13/C). Da keines der MRE-Deletionskonstrukte signifikant durch Aldosteron stimulierbar war, scheint es sich bei dem 65 bp langen MRE1.3 um den Minimalpromotor für diesen Aktivierungsmechanismus zu handeln.

A) GCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGCCGCGCCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAG MRE1.3
 SP1
 GCAGCAGGCCCTTCAAACCCGCACGGTGTGAGCGCCCGCCGCGCCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAG MRE1.3mut1
 GCAGCAGCCTCCTCICCTCCGCACGGTGTGAGCGCCCGCCGCGCCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAG MRE1.3mut 2
 GCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGGTGTGAGCGCC..... MRE1.3d (35bp)
 GCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGCCGCGCC..... MRE1.3e (45bp)
 GCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGCCGCGCCGAGGCGGCCG..... MRE1.3f (55bp)
 GCAGCAGCCTCCTCCCCCGCA.....CGGGAGTCCCGAG MRE1.3mut Δ (35bp)

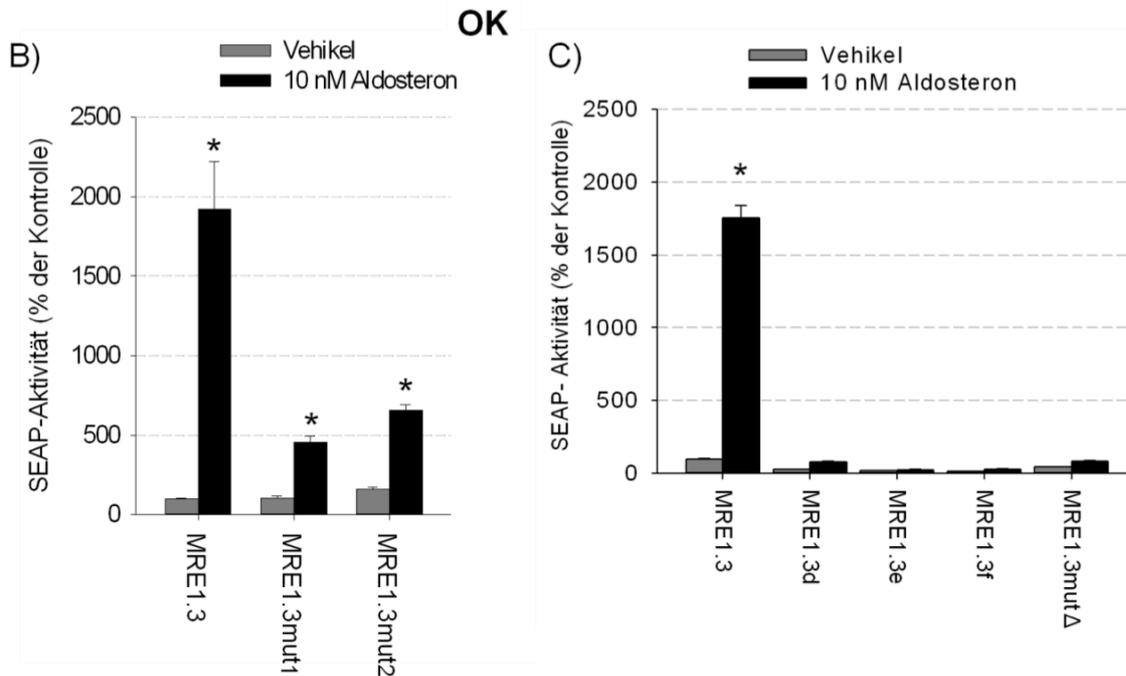


Abb. 13: Analysen zur Relevanz der SP1-Bindestelle für die Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors. A) Dargestellt werden die für die Reporteragen-Assays verwendeten Promotorkonstrukte. B) Mit hMR transient transfizierte OK-Zellen wurden mit den Promotorkonstrukten MRE1.3, MRE1.3mut1 oder MRE1.3mut2 co-transfiziert und anschließend mit DMSO oder 10 nM Aldosteron inkubiert. Mutationen in der SP1-Bindestelle des EGFR-Promotors führen unabhängig vom Zelltyp im Vergleich zu MRE1.3 zu einer stark reduzierten Aldosteron-abhängigen Aktivierung des EGFR-Promotors. C) Wiederholung der Reporteragen-Assays in OK-Zellen mit verschiedenen MRE1.3-Deletionskonstrukten. Kürzere Fragmente, die nicht die komplette 65 bp lange MRE1.3-Sequenz enthalten, zeigen keine signifikante Promotoraktivität nach Stimulation mit Aldosteron mehr, wohingegen das Vollängenkonstrukt eine ca. 18fache MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung im Vergleich zur Inkubation mit DMSO zeigt (N=3-6; n= 6-18; Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM, * p≤ 0,05).

3.1.2.5. SP1-Hemmung durch chemischen Inhibitor

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 für die MR/Aldosteron-abhängige EGFR-Promotoraktivierung wurde durch Wiederholung der SEAP-Reporter-Gen-Assays mit dem MRE1.3-Promotorkonstrukt in transienten hMR-Zellen und unter Verwendung von WP631, einem Inhibitor von SP1, näher charakterisiert. Bei WP631 handelt es sich um ein Antibiotikum der Klasse der Bisanthracycline, welches allgemein die SP1-initiierte Transkription hemmt. Mit 10 nM Aldosteron inkubierte HEK293-Zellen zeigten im Vergleich zu Zellen unter Kontrollbedingungen mit DMSO erneut eine 4-fache Aktivierung der SEAP-Reporter-Genaktivität. Die zusätzliche Inkubation mit dem Inhibitor WP631 führte sowohl zur Hemmung der basalen als auch der Aldosteron-induzierten Promotoraktivität (Abb. 14/1/A). Um zu untersuchen, ob SP1 auch bei der klassischen genomischen MR-Wirkung von Bedeutung ist, wurden die Reporter-Gen-Assays mit dem Glukokortikoid-responsiven Element (GRE) in HEK293-Zellen wiederholt. Die mit hMR sowie GRE-Plasmid transient transfizierten Zellen zeigten nach Stimulation mit Aldosteron eine 6-fache Steigerung der GRE-Aktivität. Eine Inkubation mit WP631 führte in diesem Fall nicht zur Hemmung der Aldosteron-abhängigen Promotoraktivierung. Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen mit DMSO konnte auch hier eine ca. 8-fache Steigerung der SEAP-Reporter-Genaktivität nach Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 14/1/B).

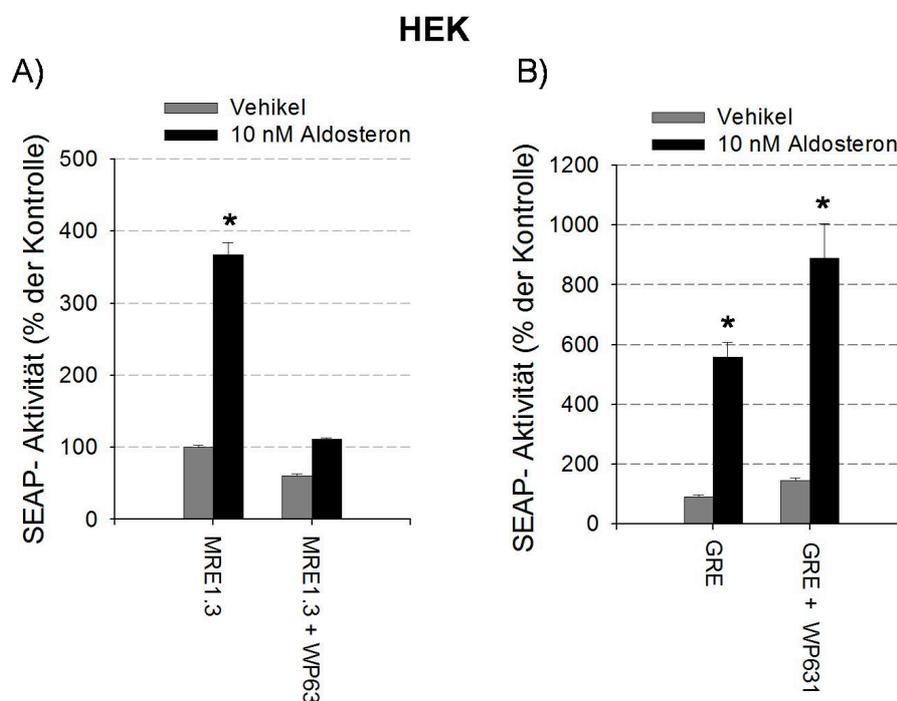


Abb. 14/1: Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 für die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung. A) Mit MRE1.3 sowie hMR transfizierte HEK293-Zellen zeigen nach Inkubation mit dem Inhibitor WP631 in Reporter-Gen-Assays eine Hemmung der Aldosteron-induzierten EGFR-Promotoraktivierung (N=3; n= 6-9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05). B) Die MR/Aldosteron-abhängige GRE-Aktivierung wird durch Hemmung von SP1 mittels WP631 nicht beeinflusst (N=3; n= 6-9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05).

Zellspezifische Effekte sollten durch die Wiederholung der Experimente in OK-Zellen ausgeschlossen werden. Während Reportergen-Assays mit dem EGFR-Promotorkonstrukt MRE1.3 nach Inkubation mit 10 nM Aldosteron eine ca. 16-fache Erhöhung der Promotoraktivität zeigten, führte eine zusätzliche Inkubation mit dem Inhibitor zur Hemmung der Aldosteron-induzierten Erhöhung der SEAP-Aktivität (Abb. 14/2/C). Auch in OK-Zellen wurde die MR/Aldosteron-induzierte GRE-Aktivierung nicht durch die Verwendung von WP631 beeinflusst. In beiden Versuchsansätzen konnte nach Stimulation mit dem Liganden eine erhöhte Aktivität des Reporters gemessen werden (Abb. 14/2/D). Eine Dosis-abhängige Reduktion der MRE1.3-Promotoraktivität konnte ebenfalls in OK-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 14/2/E). Während die Inkubation mit 1 μ M WP631 keinen Effekt auf die Aldosteron-induzierte Reporteraktivierung zeigte, führten Inhibitor-Konzentration von 5 μ M sowie 10 μ M zur Hemmung (Abb. 14/2/E).

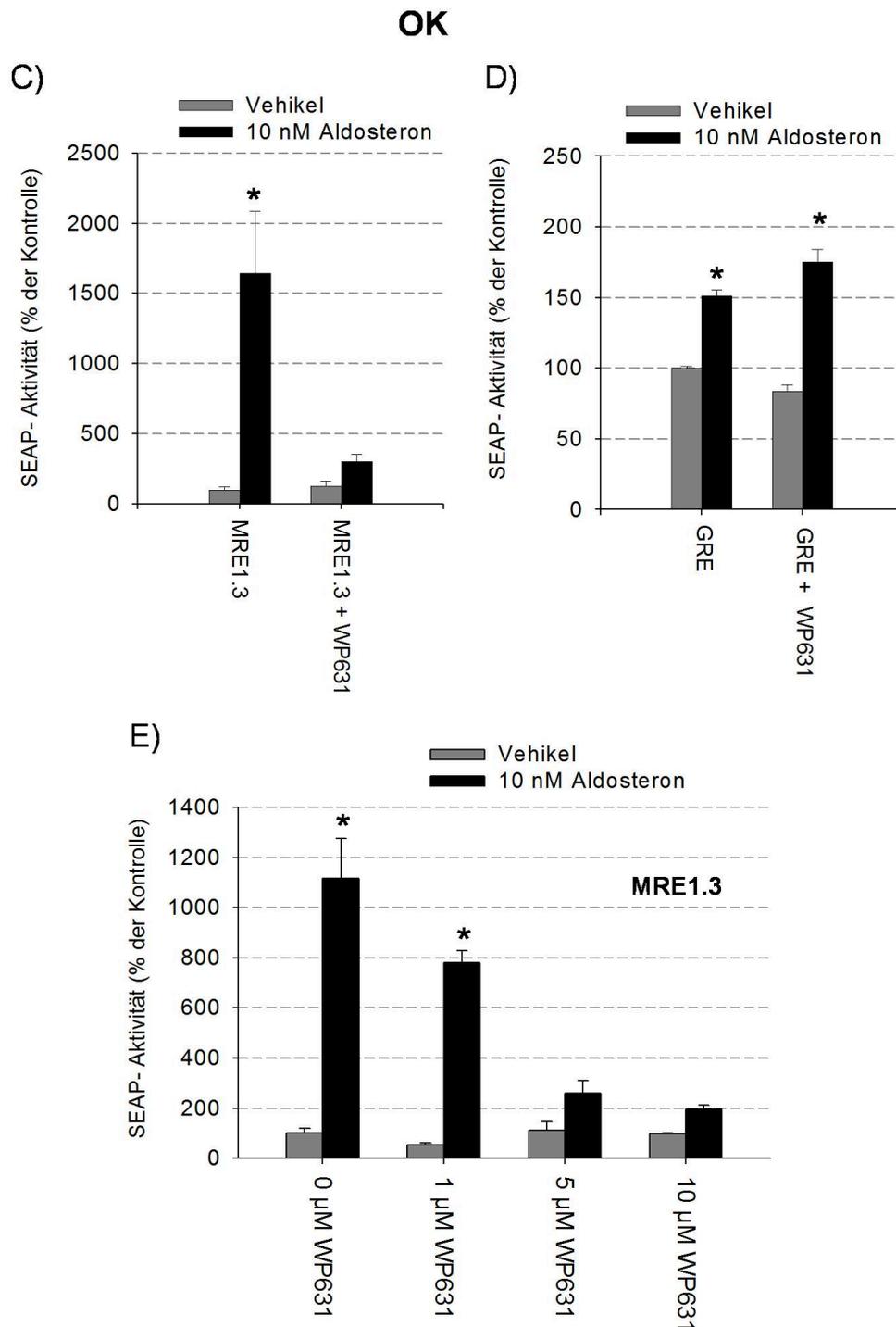


Abb. 14/2: Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 für die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung in OK-Zellen. C) OK-Zellen zeigen nach Inkubation mit dem SP1-spezifischen Inhibitor WP631 in Reporteragen-Assays eine Hemmung der Aldosteron-induzierten MRE1.3-Promotoraktivierung (N=3-4; n= 6-12; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$). D) Die MR/Aldosteron-abhängige GRE-Aktivierung wird durch die Hemmung von SP1 mittels WP631 nicht beeinflusst (N=10; n= 30; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$). E) Die Hemmung der Aldosteron-induzierten MRE1.3-Aktivierung erfolgt Dosis-abhängig (N=1-11; n= 3-33; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

3.1.2.6. SP1-Knock-down mittels spezifischer siRNA

Um unspezifische Effekte des Inhibitors auf andere Transkriptionsfaktoren oder die Zellen per se ausschließen zu können, wurden die SEAP-Reporter-Gen-Assays mit spezifischer siRNA gegen SP1 wiederholt. Eine Analyse der Effektivität der verwendeten siRNA erfolgte in einer Zeitreihe. Hierfür wurden HEK293-Zellen entweder mit scrambled siRNA als Negativkontrolle oder SP1-siRNA transfiziert und nach 48 h, 72 h und 96 h Gesamt-RNA oder nach 72 h, 96 h und 120 h Proteine isoliert. Mittels qPCR und Western Blot Analyse erfolgte die Bestimmung der Menge an SP1-mRNA oder SP1-Protein im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Behandelt man die HEK293-Zellen mit SP1-spezifischer siRNA, so ließ sich bereits nach 48 h bzw. 72 h eine Reduktion der mRNA-Menge um ca. 60% auf einen SP1-mRNA-Gehalt von 40% nachweisen. Nach 96 Stunden konnte eine mRNA-Menge von ca. $20,9 \pm 4\%$ der Kontroll-SP1-mRNA-Menge aus unbehandelten Zellen detektiert werden. Bei der Verwendung von scrambled siRNA konnten in qPCR-Analysen keine signifikanten Änderungen der SP1-mRNA Menge nachgewiesen werden. Scrambled siRNA enthält keine spezifischen Zielsequenzen und sollte somit keine regulatorischen Effekte zeigen, was in unseren Experimenten bestätigt werden konnte (Abb. 15/A). Mittels Western Blot-Analysen sollte anschließend der SP1-Proteingehalt in den mit SP1-siRNA, scrambled siRNA und ohne siRNA behandelten Zellen untersucht und miteinander verglichen werden. Nach 72 h und 96 h SP1-siRNA-Inkubation konnte im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine SP1-Proteinmenge von ca. $41 \pm 4\%$ der Kontrolle, 120 h nach Transfektion mit siRNA eine Proteinmenge von $34,5 \pm 6\%$ nachgewiesen werden. Zellen, welche mit scrambled siRNA transfiziert wurden, zeigten keine signifikanten Änderungen der SP1-Proteinmenge (Abb. 15/B).

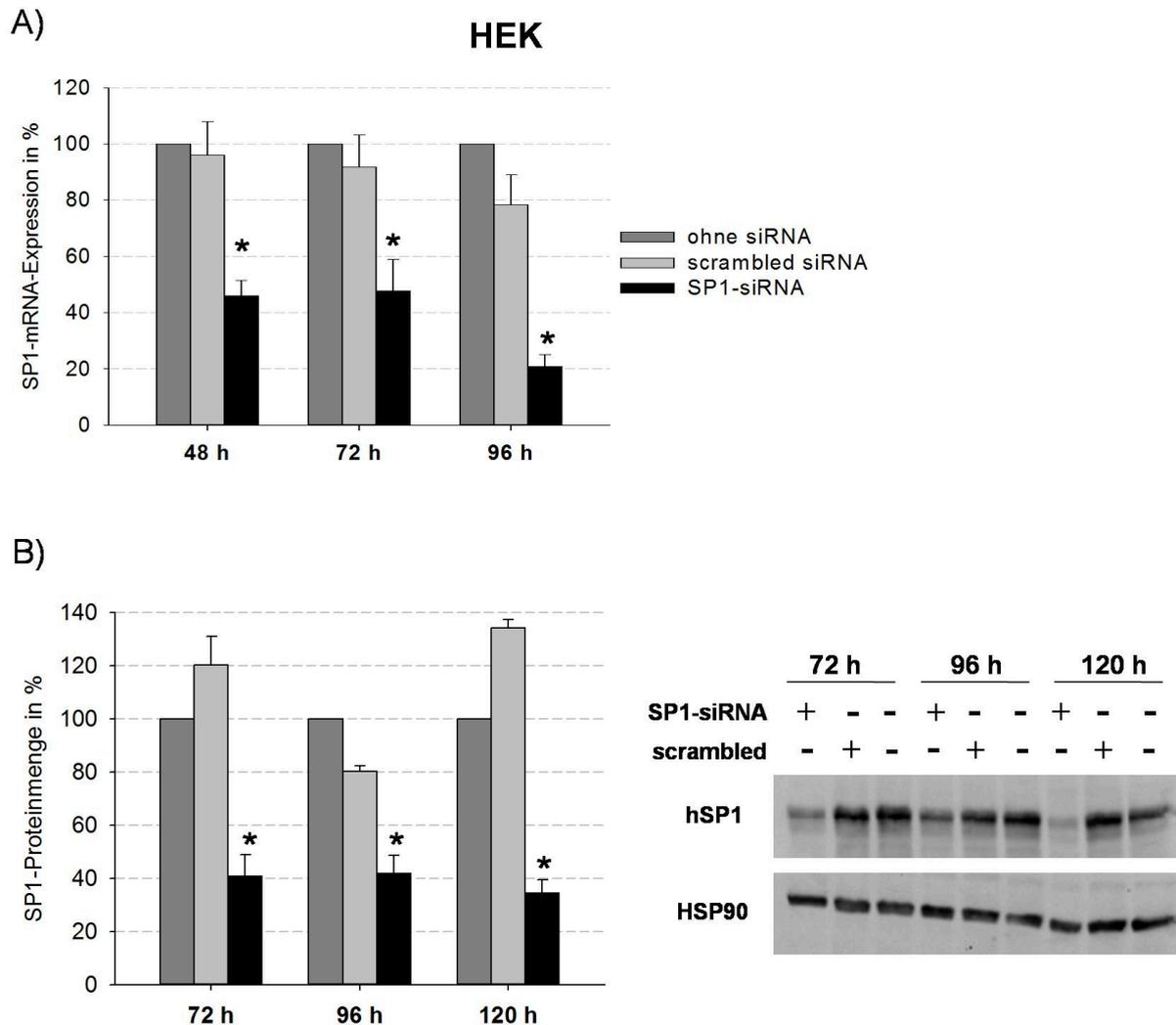


Abb. 15: SP1-Knock-down mittels spezifischer siRNA in HEK293-Zellen. A) Dargestellt ist die mittels qPCR ermittelte SP1-mRNA-Expression in Zellen, die für 48 h, 72 h und 96 h mit scrambled siRNA oder SP1-siRNA inkubiert wurden (N=3; n=9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$). B) Dargestellt werden die Zusammenfassung der Analysen zur SP1-Proteinexpression nach Inkubation mit scrambled siRNA oder SP1-siRNA (links) sowie ein repräsentativer Western Blot (rechts). Die Inkubation von HEK293-Zellen mit spezifischer SP1-siRNA führt bereits nach 48 h auf mRNA-Ebene sowie nach 72 h auf Protein-Ebene zu einer signifikanten Reduktion der SP1-Menge, wohingegen die Inkubation mit scrambled siRNA im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Veränderungen bewirkt. Zur Normierung sowie als Kontrollprotein für eine unveränderte Proteinexpression wurde HSP90 verwendet (N=3; n=9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$). A+B) Als Kontrolle dienten jeweils Zellen, die ohne siRNA, jedoch mit dem spezifischen Transfektionsreagenz inkubiert wurden.

Im Anschluss an diese Voruntersuchungen erfolgte eine Wiederholung der SEAP-Reporter-Gen-Assays unter Verwendung der spezifischen siRNA. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit hMR, MRE1.3 und entweder SP1-siRNA, scrambled siRNA oder ohne siRNA für 96 h co-transfiziert anschließend für weitere 48 h mit 10 nM Aldosteron oder DMSO inkubiert. Stimulation mit Aldosteron führt in den MRE1.3 transfizierten Zellen ohne

siRNA im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen zu einer 3 bis 3,5 fachen Steigerung der Promotoraktivität. Eine Co-Transfektion mit spezifischer SP1-siRNA führt zu einer Hemmung der MR/Aldosteron-abhängigen EGFR-Promotoraktivierung. Eine Stimulation mit dem Liganden konnte nicht mehr zu einer signifikanten Expressionssteigerung des Reportergens im Vergleich zu HEK293-Zellen unter Kontrollbedingungen mit DMSO führen. Mit scrambled siRNA transfizierte Zellen zeigten hingegen keinen Effekt in der Aldosteron-induzierten Steigerung der MRE1.3-Promotoraktivität. Auch im Rahmen dieser Versuchsbedingungen konnte eine etwa 3-fache Erhöhung der Reporterogenaktivität detektiert werden. Es wurde kein signifikanter Einfluss der siRNA auf die basale Promotoraktivität des MRE1.3 nachgewiesen (Abb. 16). Diese Resultate unterstützen die Hypothese, dass der Transkriptionsfaktor SP1 für die Aldosteron-abhängige Aktivierung des EGFR-Promotors notwendig ist.

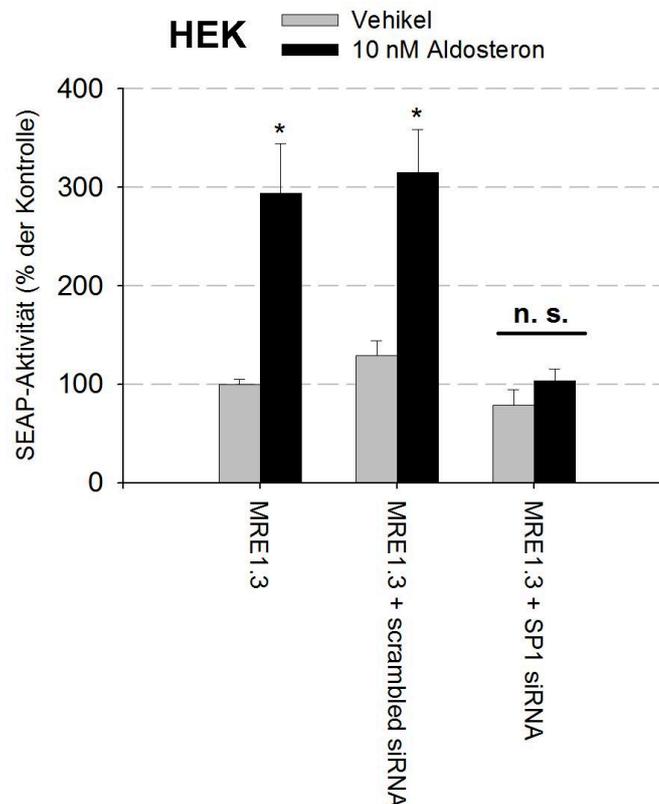


Abb. 16: SP1-Knock-down mittels spezifischer siRNA in HEK293-Zellen hemmt die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung. Reportergen-Assays in mit hMR sowie MRE1.3 transfizierten Zellen zeigen eine Hemmung der MR/ Aldosteron-abhängigen Aktivierung des EGFR-Promotors nach SP1-Knock-down mit spezifischer siRNA. Inkubation mit scrambled siRNA als Negativkontrolle zeigt keinen Einfluss. Als Kontrolle dienten Zellen, die weder mit scrambled noch SP1-siRNA, jedoch mit Transfektionsreagenz inkubiert wurden (N=3; n=6-9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

3.1.3. Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP3 für die MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung des EGFR-Promotors

3.1.3.1. Bindung von MRE1.3 an rekombinantes SP3

Da sich die Transkriptionsfaktoren SP1 und SP3 ein gemeinsames Bindemotiv teilen und an dieses sowohl als Homo- als auch als Heterodimere binden können, wurde der Einfluss von SP3 auf die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung untersucht. Hierfür sollte zunächst mittels EMSA die Bindung von rekombinantem humanen SP3 an eine biotinylierte MRE1.3-Sonde untersucht werden. Als Positivkontrolle diente eine biotinylierte Sonde mit der SP1-Konsensussequenz, welche auch von SP3 gebunden wird (SP1/SP3cons). Eine spezifische Bindung des rhSP3 an die biotinylierte SP1/SP3cons-Sonde konnte anhand einer signifikanten Bande mittels EMSA nachgewiesen werden. Die Entstehung zusätzlicher Banden könnte auf unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen des Transkriptionsfaktors bzw. den verschiedenen Isoformen des Proteins beruhen (Abb. 17/A). Unter Verwendung der biotinylierten MRE1.3-Sonde entsteht eine schwächere SP3-Bande, was im Vergleich zu SP1/SP3cons auf eine deutlich schwächere Bindung von rhSP3 an die DNA-Sequenz hindeutet. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Transkriptionsfaktor SP3 eine geringere Affinität für die Bindung an die biotinylierte MRE1.3-Sonde im Vergleich zur SP1/SP3-Konsensussequenz aufweist (Abb. 17/B).

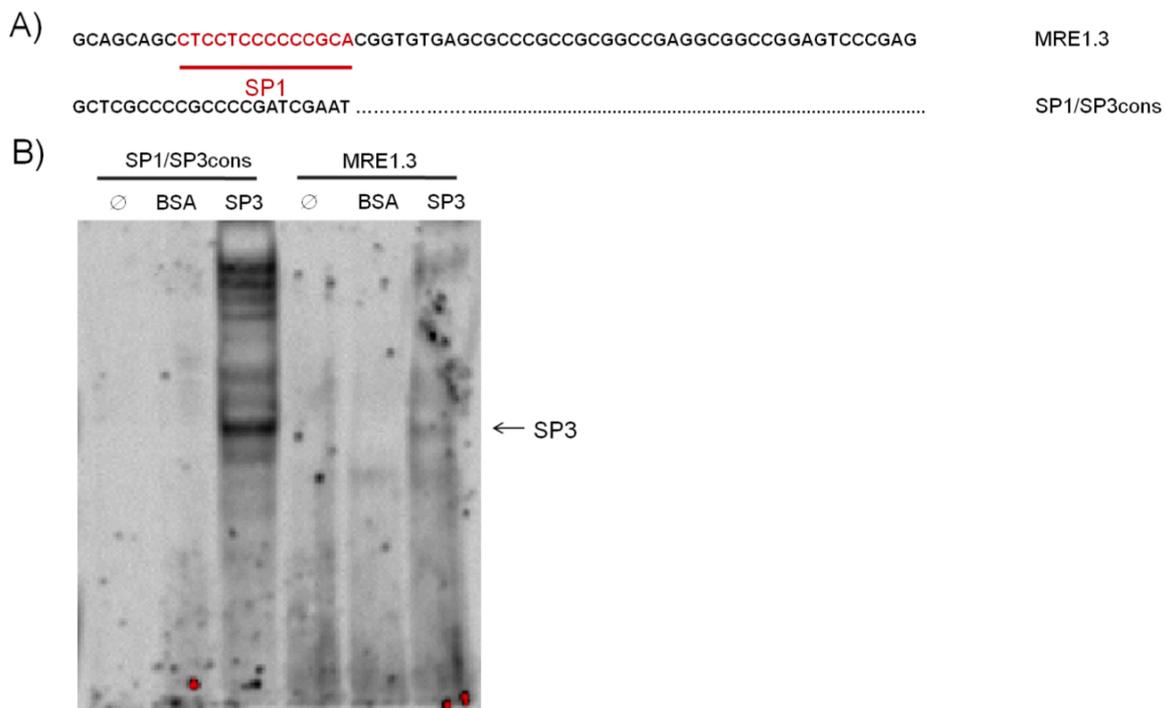


Abb. 17: Bindung von rekombinantem humanem SP3 an biotinylierte SP1cons- und MRE1.3-Sonde. A) Dargestellt sind die verwendeten biotinylierten Sonden MRE1.3 sowie die SP1/SP3-Konsensussequenz. B) Während die SP1/SP3-Konsensussequenz eine starke Bindung an rekombinantes humanes SP3 zeigt, bindet MRE1.3 nur sehr schwach an den Transkriptionsfaktor. Die Sonden wurden jeweils mit 100 ng BSA, 100 ng SP3 oder ohne Protein (Ø) inkubiert (N=3).

3.1.3.2. SP3-Knock-down mittels spezifischer siRNA

Nachdem eine schwache Bindung von rhSP3 an MRE1.3 nachgewiesen werden konnte, sollte die Bedeutung des Transkriptionsfaktors für die MR/Aldosteron- induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors untersucht werden. Hierfür wurde zunächst mittels spezifischer siRNA die Menge an SP3-Protein in den Zellen reduziert. Das Überprüfen der Funktionalität der SP3-siRNA erfolgte mittels Western Blot Analyse in Lysaten aus HEK293-Zellen, die entweder mit SP3-siRNA, scrambled siRNA oder ohne siRNA transfiziert und für 96 h inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgten die Isolierung der Proteine und der Nachweis der SP3-Proteinmenge in den Zelllysaten. Die mit scrambled siRNA inkubierten HEK293-Zellen, zeigten nach 96 h im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen keine signifikanten Veränderungen des SP3-Proteingehaltes. Unter Verwendung der spezifischen SP3-siRNA wurde hingegen eine signifikante Reduktion der SP3-Proteinmenge auf $16,4 \pm 5 \%$ des SP3-Proteingehaltes aus untransfizierten Zellen detektiert (Abb. 18). Als Negativkontrolle wurde β -Aktin verwendet. Die Expression dieses *Housekeeping*-Gens wird durch die siRNA nicht beeinflusst und bleibt demnach in seiner Proteinmenge unverändert. Die durchgeführten Western Blot Analysen bestätigen dies (Abb. 18).

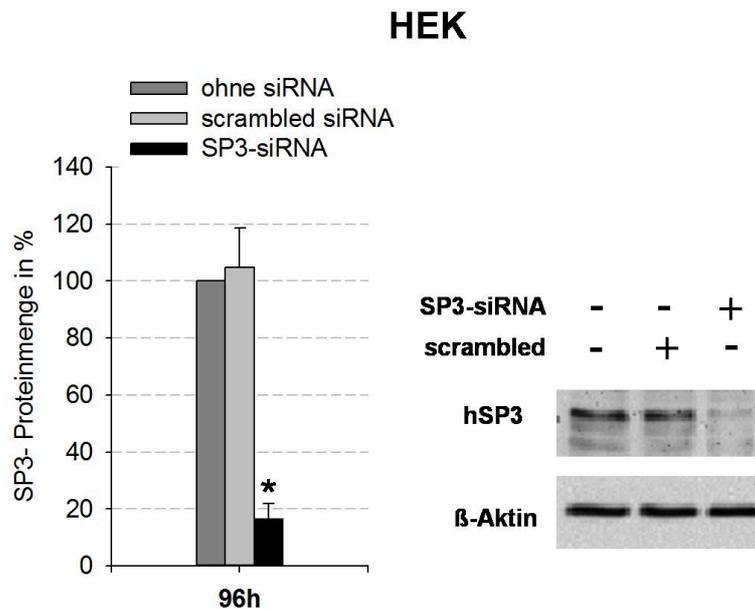


Abb. 18: SP3-Knock-down in HEK293-Zellen mittels spezifischer siRNA. Dargestellt werden die Zusammenfassung der Analysen zur SP3-Proteinexpression (links) sowie ein repräsentativer Western Blot (rechts) nach Inkubation von HEK293-Zellen mit scrambled siRNA oder SP3-siRNA für 96 h. Die Inkubation mit spezifischer SP3-siRNA führt im Gegensatz zur Verwendung von scrambled siRNA zur signifikanten Reduktion der SP3-Proteinmenge. Zur Normierung sowie als Kontrollprotein für eine unveränderte Proteinexpression wurde β -Aktin verwendet (N=3; n=9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05). A+B) Als Kontrolle dienen jeweils Zellen, die ohne siRNA oder scrambled siRNA, jedoch mit dem spezifischen Transfektionsreagenz inkubiert wurden.

Da die Verwendung der spezifischen SP3-siRNA zu einer signifikanten Reduktion der SP3-Proteinmenge in HEK293-Zellen führte, sollten SEAP-Reporter-Gen-Assays angeschlossen werden, welche die Bedeutung des Transkriptionsfaktors für die MR/Aldosteron-abhängige EGFR-Promotoraktivierung aufklären sollten. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit dem hMR-Plasmid, MRE1.3 sowie entweder ohne siRNA, mit scrambled siRNA oder SP3-siRNA co-transfiziert und für weitere 48 h mit 10 nM Aldosteron oder DMSO inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung der Reporter-Genaktivität mittels Sekretorischer Alkalischer Phosphatase (SEAP). Aldosteron induzierte die MR-abhängige Aktivierung des MRE1.3-Promotorelementes und führte zu einer 3,5 bis 4-fachen Steigerung der Promotoraktivität. Eine Co-Transfektion sowohl mit scrambled siRNA als auch SP3-siRNA zeigte keinen Einfluss auf die Aldosteron-induzierte MRE1.3-Aktivierung. Nach Stimulation mit 10 nM Aldosteron wurde die MR-abhängige EGFR-Promotoraktivität ca. 4,3-fach (scrambled siRNA) bzw. 4-fach (SP3-siRNA) gesteigert (Abb. 19). Trotz schwacher *in vitro* Bindung von SP3 an MRE1.3 konnte mittels Reporter-Gen-Assays und SP3-*Knock-down* kein Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die MR/Aldosteron-abhängige EGFR-Promotoraktivierung nachgewiesen werden. Ein *Knock-down* des Proteins führte nicht zur Reduktion der Aldosteron-induzierten Überexpression des Reportergens, was einen Einfluss von SP3 auf den Mechanismus unwahrscheinlich erscheinen lässt.

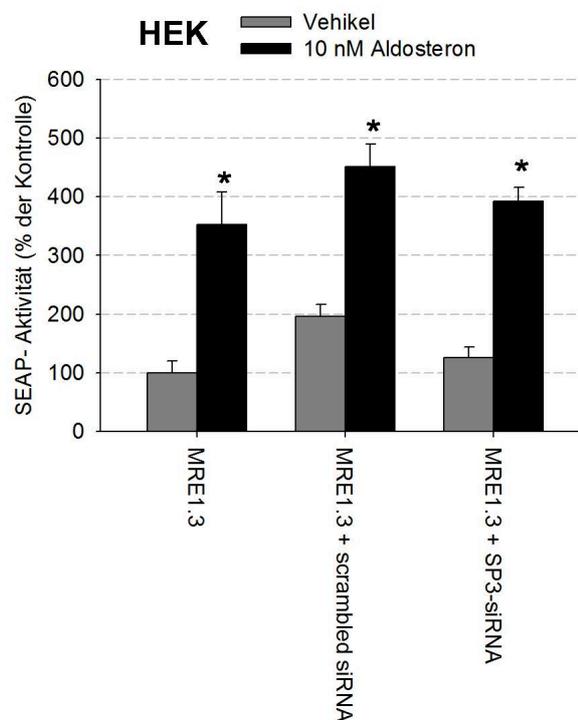


Abb. 19: Einfluss des Transkriptionsfaktors SP3 auf die MR/Aldosteron-induzierte MRE1.3-Aktivierung. Sowohl der *Knock-down* des Transkriptionsfaktors SP3 mit spezifischer siRNA als auch die Inkubation mit scrambled siRNA als Negativkontrolle zeigen in Reporter-Gen-Assays keinen Einfluss auf die Aldosteron-abhängige Aktivierung des EGFR-Promotors. Als Kontrolle dienten Zellen, die weder mit scrambled noch SP3-siRNA, jedoch mit Transfektionsreagenz inkubiert wurden (N=3; n=9-48; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05).

3.2. Pathophysiologische Relevanz der SP1-Hemmung für die EGFR-Expression in HAoSMC und A7r5-Zellen

Nachdem sowohl *in vitro* als auch im Zellmodell ein Einfluss des Transkriptionsfaktors SP3 auf die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung ausgeschlossen und SP1 als wichtiger Kofaktor identifiziert werden konnte, sollte die pathophysiologische Relevanz der gewonnenen Daten anhand von zwei verschiedenen Arten glatter Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden zum einen HAoSMC- (primäre humane glatte Gefäßmuskelzellen) und zum anderen A7r5-Zellen (glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte) ausgewählt und hinsichtlich ihrer EGFR-Expression nach chemischer SP1-Inhibierung mittels Western Blot Analyse untersucht. In Vorversuchen konnte eine MR/Aldosteron-abhängige EGFR-Expressionssteigerung in Aorta, Niere und Herz bereits nachgewiesen werden [156,158], sodass die der MR/Aldosteron-abhängigen EGFR-Expression in Primärkultur und Zelllinie untersucht werden sollte. Stimuliert man die Zellen mit 10 nM Aldosteron und vergleicht die EGFR-Expression mit der Proteinmenge aus unstimulierten, mit DMSO behandelten Zellen, so erhöht sich der EGFR-Proteingehalt signifikant um das ca. 2,5-fache in HAoSMC-Zellen (Abb. 20/A) und um das etwa 1,6-fache in A7r5-Zellen (Abb. 20/B). Behandelt man die Zellen zusätzlich mit 1 μ M des spezifischen SP1-Inhibitors WP631, führt dies in HAoSMC sowohl zur Reduktion der basalen als auch der Aldosteron-induzierten EGFR-Expression. So führte die Inkubation mit WP631 zu einer Reduktion des EGFR-Proteingehaltes auf einen Wert von $30 \pm 9\%$ der Menge aus HAoSMC mit DMSO sowie auf einen Anteil von $12 \pm 8\%$ der Proteinmenge von mit 10nM Aldosteron stimulierten HAoSMC (Abb. 20/A). In A7r5-Zellen, die neben DMSO zusätzlich mit WP631 inkubiert wurden, war die basale EGFR-Expression nicht beeinflusst, wohingegen der stimulatorische Effekt des Liganden Aldosteron auf die Expression des EGF-Rezeptors inhibiert wurde (Abb. 20/B). Die Resultate unter Verwendung des spezifischen SP1-Inhibitors in glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen sowie der Ratte verdeutlichen die wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors SP1 als Kofaktor für die MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung des EGFR-Promotors und daraus resultierend für die Expression des EGF-Rezeptors.

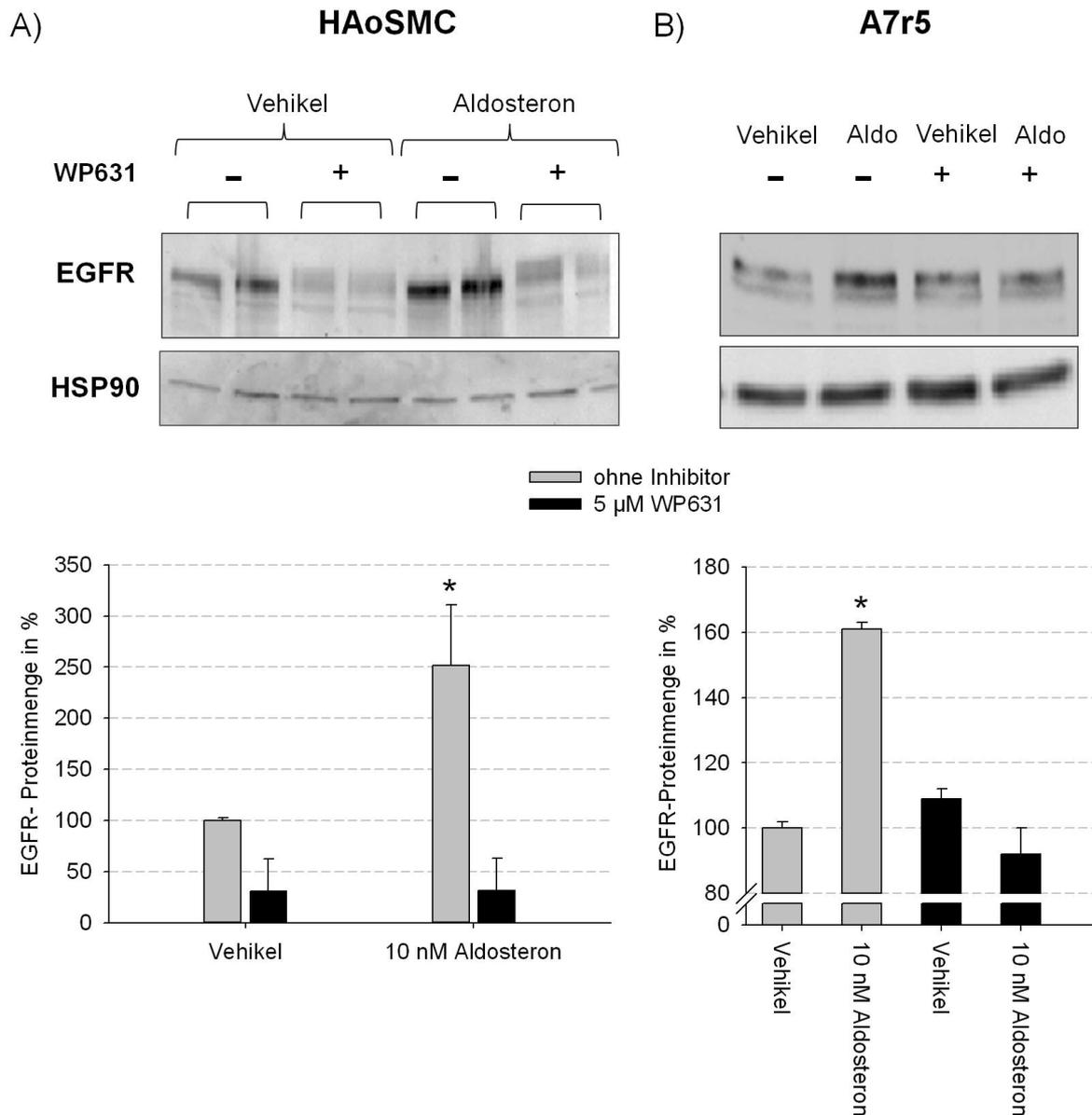


Abb. 20: Einfluss der SP1-Hemmung auf die EGFR-Expression in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen. Dargestellt werden jeweils ein repräsentativer Western Blot sowie die Zusammenfassung der Western Blot Analysen nach Inkubation von HAoSMC- (Mensch) und A7r5-Zellen (Ratte) mit und ohne SP1-Inhibitor WP631. A) Die Hemmung des Transkriptionsfaktors SP1 bewirkt in HAoSMCs eine Reduktion der basalen sowie Verhinderung der Aldosteron-induzierten EGFR-Proteinexpression. B) In A7r5-Zellen führt die Inkubation mit WP631 zu einer Hemmung der Aldosteron-induzierten EGFR-Proteinexpression. Die basale Expression wird nicht beeinflusst (N=3; n=6-9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05).

3.3. Einfluss der MR-Aktivierung auf die Lokalisierung von EGFP-SP1 in HEK293-Zellen

Nach Identifikation des Aldosteron-induzierten Mechanismus der EGFR-Promotoraktivierung durch Bindung von MR und SP1 an das MRE1.3-Promotorelement sollten sowohl EGFP-markierte SP1- als auch RFP-gekoppelte MR- Proteinmoleküle in der Zelle lokalisiert werden, um einen Einfluss der MR-Aktivierung auf die SP1-Lokalisierung zu untersuchen. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit EGFP-SP1- und RFP-MR-Plasmiden transfiziert und nach 24 h mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Im Anschluss an die Untersuchung unter basalen Bedingungen wurde den Zellen 10 nM Aldosteron appliziert und über einen Zeitraum von 20 min die MR- und SP1-Lokalisierung bestimmt. Während EGFP-SP1 in den HEK293-Zellen zunächst sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden konnte, ließ sich RFP-markierter MR fast ausschließlich im Zytoplasma der Zellen nachweisen (Abb. 21/A). EGFP-SP1 liegt somit ubiquitär in den HEK293-Zellen vor, wohingegen der inaktive MR lediglich im Zytosol lokalisiert ist. Inkubiert man die Zellen mit 10 nM Aldosteron, so lassen sich die RFP-MR-Moleküle bereits nach ca. 12 min hauptsächlich im Nukleus und kaum im Zytoplasma nachweisen, wohingegen EGFP-SP1 weiterhin ubiquitär zu detektieren war (Abb. 21/B). Die Bindung von Aldosteron an den MR bewirkt den Erwartungen entsprechend eine Translokation in den Nukleus, wohingegen keine zusätzliche nukleäre Anreicherung von EGFP-SP1 beobachtet werden konnte.

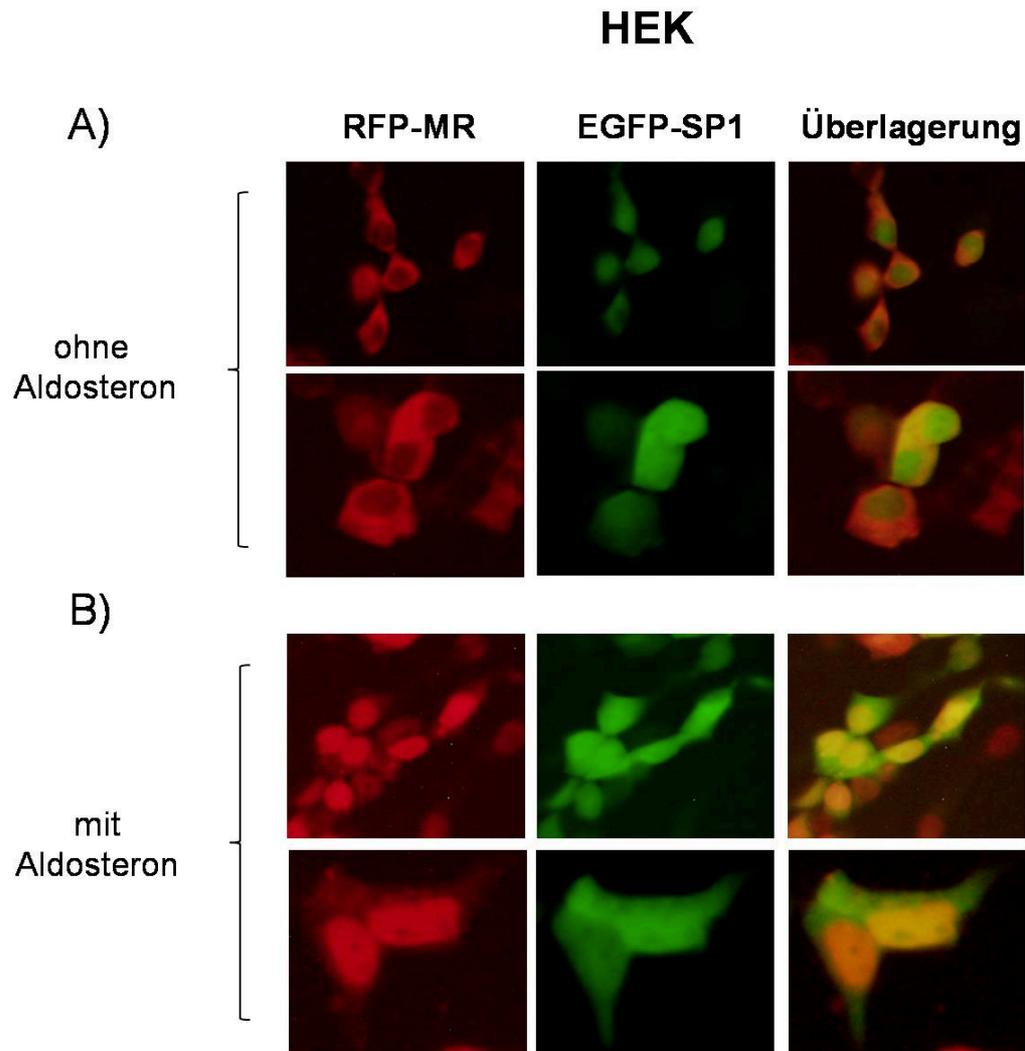


Abb. 21: Lokalisierung von RFP-MR und EGFP-SP1 in HEK293-Zellen. A) Der inaktivierte RFP-MR (Zeitpunkt $t = 0$ min) ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen das EGFP-markierte SP1-Protein ubiquitär in Zellkern und Zytoplasma nachweisbar ist. B) Nach Inkubation mit Aldosteron transloziert der RFP-markierte MR in den Zellkern ($t_{1/2} = 6$ min). Die Lokalisierung des EGFP-SP1-Proteins wird durch die Inkubation mit Aldosteron nicht beeinflusst.

3.4. Genomweite Suche und Identifizierung weiterer Mineralokortikoid-responsiver Elemente (MREs)

3.4.1. Genomweite Suche nach Promotorregionen, die MRE1.3 ähneln

Mit MRE1.3 konnte ein neues für den Mineralokortikoidrezeptor spezifisches responsives Element auf dem EGFR-Promotor eingegrenzt und charakterisiert werden. Die Besonderheit dieses Elementes liegt darin, dass sich innerhalb der DNA-Sequenz kein klassisches GRE-Element nachweisen lässt. Die Identifikation weiterer responsiver Elementen, die putative MR-regulierte Gene kennzeichnen, sollte zunächst anhand einer genomweiten Suche nach Sequenzen, die MRE1.3 ähneln oder mittels Infixen des MRE1.3 *in silico* erfolgen. Diese Suche wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ivo Grosse aus dem Institut für Bioinformatik (MLU Halle-Wittenberg) von Dr. Jens Keilwagen durchgeführt. Dieser analysierte die Ähnlichkeit anhand optimaler semi-globaler Alignments zwischen allen humanen Promotoren und den drei Fragmenten

MRE1.3

GCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGACGCGGCCGAGGCGGCCGG
AGTCCCGAG

MRE1.3'

CCTCCTCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCG

sowie MRE1.3"

CCTCCTCCCCCGCAC.

MRE1.3' wurde ausgewählt, da es die in den Abschnitten 3.1.1. bis 3.1.3. charakterisierte SP1-Bindestelle enthält, welche für die MR/Aldosteron-abhängige EGFR-Promotoraktivierung eine entscheidende Rolle spielt. Tabelle 14 stellt die Gene mit dem höchsten Prädiktionswert dar, welche bei der Suche auf Grund ihrer Sequenzähnlichkeit als potenzielle Kandidaten identifiziert werden konnten. Hierbei lag der Score für die aufgelisteten Gene bei -0.81, bei einem maximal zu erreichenden Wert von -1.

Tab. 14: Liste der mittels semi-globalem Sequenzvergleich erhaltenen putativen MR-regulierten Gene

Name	Lokalisation	Gen
uc001art.2	chr1:11072429-11073784	TAR DNA binding protein
uc001fpy.3	chr1:156721222-156721793	Hepatoma-Derived Growth Factor Isoform a
uc002rxu.2	chr2:54683204-54753555	Spectrin, Beta, Non-Erythrocytic 1 Isoform 1
uc002wav.1	chr2:242092641-242097244	Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit
uc002wcq.3	chr2:242800991-242801308	Programmed Cell Death 1 Precursor
uc003eqa.3	chr3:133748647-133749170	Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 2A1
uc011byf.1	chr4:37978780-37979120	TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family,
uc003kuc.2	chr5:126112583-126113200	Lamin B1
uc003kzh.2	chr5:133706620-133707286	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2B
uc003zhc.2	chr9:2015092-2029022	SWI/SNF-Related Matrix-Associated
uc004cyx.2	chrX:19086953-19140927	G Protein-Coupled Receptor 64 Isoform 1
uc004eqz.2	chrX:118110045-118112414	LON Peptidase N-terminal Domain and Ring Finger
uc001jjv.1	chr10:56424023-57387952	Protocadherin 15 Precursor
uc001opf.2	chr11:69518645-69519356	Fibroblast Growth Factor 19 Precursor
uc001tei.2	chr12:96184088-96184786	Netrin 4 Precursor
uc010tvb.1	chr14:75894670-75904623	Jun Dimerization Protein 2 Isoform a
uc010twn.1	chr14:92909459-92913763	Solute Carrier Family 24 Member 4 Isoform 3
uc002eyx.2	chr16:70432434-70473241	ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase
uc002gea.2	chr17:6915548-6916002	Ribonuclease Kappa
uc002kom.3	chr18:10454375-10454978	Adenomatosis Polyposis Coli Down-Regulated 1
uc002yfr.1	chr20:62284699-62285030	SCG10-Like-Protein
uc003azt.2	chr22:41677049-41682219	Ran GTPase Activating Protein 1

3.4.2. Validierung der vorhergesagten Promotoren putativer MR-regulierter Gene

Eine Validierung der mittels semi-globaler Alignments vorhergesagten Promotoren (Tab. 14) erfolgte in humanen Nierenepithelzellen (HK2), welche transient mit hMR-Plasmid transfiziert und anschließend mit 10 nM Aldosteron oder DMSO für 24 h inkubiert wurden. Darauffolgend sollte Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und mittels qPCR die Expression der putativen Zielgene analysiert werden. Hierfür wurden 11 Gene ausgewählt, deren MR/Aldosteron-abhängige Regulation im renokardiovaskulären System relevant sein könnte. Das in Abbildung 22 dargestellte Diagramm zeigt die ddct-Werte bzw. die x-fache Induktion nach Inkubation mit 10 nM Aldosteron im Vergleich zur mRNA-Menge aus mit DMSO behandelten HK2-Zellen. Der mRNA-Expression aus den Kontrollzellen mit DMSO werden die Werte 0 (ddct) und 1 (x-fache Induktion) zugeordnet, wohingegen die Balken die Veränderung nach Stimulation mit Aldosteron darstellen. Für die Gene Hepatoma-Derived Growth Factor (HDGF), Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 7 (PPP1R7) und Ran GTPase-Activating Protein 1 (RanGAP1) konnte eine signifikante Veränderung der Genexpression nach Inkubation mit Aldosteron nachgewiesen werden. Während die mRNA-Menge an HDGF und PPP1R7 durch MR/Aldosteron um das ca. 2-fache sinkt, steigt die Expression der RanGAP1-mRNA auf die ca. 2-fache Menge der Kontrolle mit DMSO. Alle anderen untersuchten Gene zeigten keine signifikanten Änderungen der Genexpression in Abhängigkeit von Aldosteron-gebundenem Mineralokortikoidrezeptor (Abb. 22).

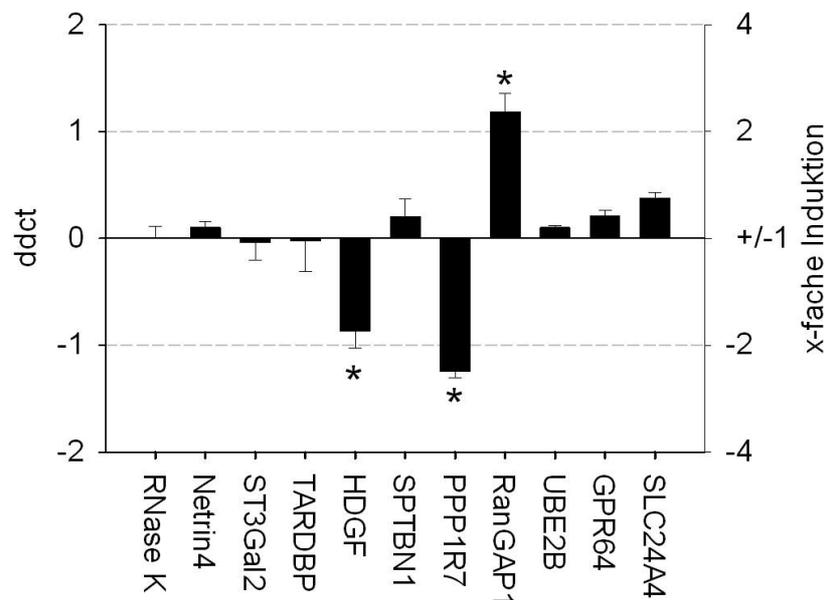


Abb. 22: Validierung putativer MR-regulierter Kandidatengene mittels qPCR-Analysen. In HK2-Zellen, die für 24 h mit Aldosteron inkubiert wurden, konnten drei der vorhergesagten Gene bestätigt werden: HDGF (Hepatoma-Derived Growth Factor), PPP1R7 (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 7) und RanGAP1 (Ran GTPase-Activating Protein 1) (N=3-5; n=3-15; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05).

3.5. Untersuchung der Korrelation zweier Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) des EGFR-Promotors mit dem Auftreten renokardiovaskulärer Erkrankungen

3.5.1. Charakterisierung der MRE1.3-SNPs

3.5.1.1. Bindung von rhSP1 an zwei SNPs des EGFR-Promotors

In dem von uns identifizierten minimalen MRE sind 2 SNPs (single nucleotide polymorphisms) bekannt. Hierbei handelt es sich um die beiden SNPs rs712830 (-191 C/A), und rs712829 (-216 G/T) der dbSNP-Datenbank. Für unsere Untersuchungen wurden dementsprechend die Promotorelemente MRE1.3 (-216 T/T; -191 C/C), MRE1.3-SNP1 (-216 G/G; -191 A/A) sowie MRE1.3-SNP2 (-216 G/G; -191 C/C) einbezogen. Da die Häufigkeit für das Auftreten eines Cytosins im Vergleich zum Adenin an Stelle -191 sowie eines Guanins verglichen mit Thymin an Stelle -216 des Promotors größer ist, handelt es sich bei MRE1.3-SNP2 um das Promotorelement, welches in der Gesamt-Population am weitesten verbreitet ist. Eine detaillierte Zusammenfassung der Allelfrequenzen der verschiedenen SNPs innerhalb der Weltbevölkerung kann dem Anhang entnommen werden (siehe B1.1). Auf Grund der nachgewiesenen Relevanz von MRE1.3 für die MR/Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung sollten die MRE1.3-Varianten hinsichtlich ihrer MR-induzierten Aktivierung charakterisiert werden. Da der Transkriptionsfaktor SP1 als wichtiger Faktor für den Aldosteron-abhängigen Aktivierungsmechanismus identifiziert werden konnte und sich die als MRE1.3-SNP2 bezeichnete Varianz innerhalb des SP1-Bindemotivs befindet, erfolgte zunächst die Analyse der Bindung von rhSP1 an die Promotorelemente mit SNPs. Hierfür wurden zunächst die in Abb. 23/A dargestellten Sequenzen in Form biotinylierter Sonden mittels EMSA hinsichtlich ihrer Bindung von rhSP1 untersucht. Als Kontrollen dienten zum einen biotinylierte Sonden ohne Protein sowie als Negativkontrolle für unspezifische Proteinbindungen Sonden mit BSA. MRE1.3 bindet, wie bereits unter 3.1.1. gezeigt, an rhSP1, welches durch die Entstehung einer spezifischen Bande nachgewiesen werden konnte. Verwendet man MRE1.3-SNP1 sowie MRE1.3-SNP2, so ließ sich diese spezifische Bindung ebenfalls detektieren, wobei beide Varianten im Vergleich zu MRE1.3 eine stärkere Bindung an SP1 aufzuweisen scheinen und somit scheinbar eine höhere Affinität für die rhSP1-Bindung zeigen. Diese Vermutung resultiert aus den entstandenen stärkeren Banden im Vergleich zum Experiment mit biotinylierter MRE1.3-Sonde (Abb. 23/B).

3.5.1.2. Bindung von SP1 aus nukleären Extrakten an MRE1.3-SNPs

Eine Analyse der *in vivo* Bindung von SP1 aus nukleären Extrakten an die MRE1.3-SNPs erfolgte mittels EMSA unter Verwendung der jeweiligen biotinylierten Sonden (Abb. 23/A aus 3.3.1.). Die Herstellung der nukleären Extrakte erfolgte aus mit hMR-Plasmid transient transfizierten HEK293-Zellen, welche anschließend für 24 h mit 10 nM Aldosteron inkubiert wurden. Unter Verwendung der MRE1.3-Sonde konnte eine Bindung an SP1 aus Zellkernextrakten durch die spezifische Bande bestätigt werden, wohingegen diese weder für MRE1.3-SNP1 noch für MRE1.3-SNP2 zu detektieren war. Eine spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors SP1 an die Promotorelemente MRE1.3-SNP1 und -SNP2 konnte somit *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Abb. 24). Der entstandene „Schmier“ deutet vielmehr auf die Entstehung eines Komplexes mit anderen Proteinen wie beispielsweise dem MR hin. SP1 könnte Bestandteil dieses Proteinkomplexes sein, könnte aber auch durch andere Faktoren verdrängt werden.

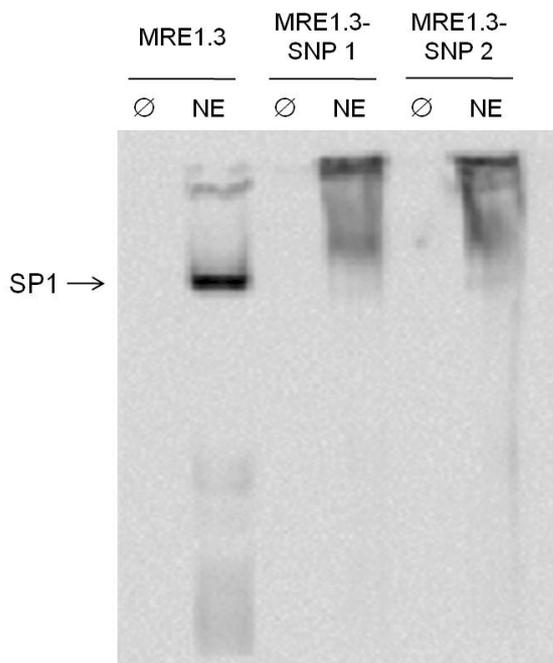


Abb. 24: Bindung von MRE1.3, MRE1.3-SNP1 sowie MRE1.3-SNP2 an SP1 aus nukleären Extrakten. Ein repräsentativer EMSA unter Verwendung einer MRE1.3-, MRE1.3-SNP1 und einer MRE1.3-SNP2-Sonde zeigt die spezifische Bindung von MRE1.3 an SP1 aus Zellkernextrakten. Im Vergleich dazu zeigen die Varianten MRE1.3-SNP1 und -SNP2 keine spezifische Bande unter Verwendung nukleärer Extrakte. Alle Sonden wurden entweder ohne Protein (∅) oder mit 50µg Gesamtprotein aus Zellkernextrakten (NE) inkubiert (N=3).

3.5.1.3. Analyse der MR/Aldosteron-abhängigen Aktivierung der MRE1.3-SNP1 und MRE1.3-SNP2 - Promotorelemente

Mit Hilfe der unter Kapitel 3.1 dargestellten Experimente konnte eine Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors nachgewiesen sowie MRE1.3 als Minimalpromotor identifiziert werden. Da sowohl MRE1.3 als auch die beiden SNP-Varianten eine Bindung an rekombinantes humanes SP1 zeigten, in nukleären Extrakten jedoch nur MRE1.3 eine direkte Bindung an SP1 aufwies, sollte die MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung der verschiedenen Promotorelemente in Reporter-Gen-Assays untersucht werden. Hierfür wurden die HEK293-Zellen mit dem Expressionsvektor für den humanen MR sowie den Reporter-Gen-Konstrukten MRE1.3 (-216 T/T; -191 C/C) als Positivkontrolle und MRE1.3-SNP1 (-216 G/G; -191 A/A) oder MRE1.3-SNP2 (-216 G/G; -191 C/C) transfiziert und anschließend für 48 h mit DMSO oder 10 nM Aldosteron inkubiert. Transiente hMR-HEK293-Zellen mit dem MRE1.3-Promotorelement zeigten nach Inkubation mit dem Liganden Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO eine ca. 4-fache Steigerung der Reporter-Gen-Aktivität. Zellen, die mit MRE1.3-SNP1 oder MRE1.3-SNP2 transfiziert wurden, zeigten hingegen nach Stimulation mit Aldosteron lediglich eine ca. 2-fache Steigerung der Promotoraktivität (Abb. 25/A). Vergleicht man, die in Abb. 25/B dargestellten Basalaktivitäten (Inkubation mit DMSO) der einzelnen Promotorelemente, so lässt sich feststellen, dass die Grundaktivität der MRE1.3-SNP1-Variante im Vergleich zum MRE1.3-Promotor um den Faktor 3 erhöht ist, während die basale MRE1.3-SNP2-Aktivität ca. 1,5-fach höher ist als die des MRE1.3 (Abb. 25/B). Ein genauer Vergleich der Aktivierbarkeit der Promotoren durch den Liganden Aldosteron ergab eine 4-fache Induktion des MRE1.3-Promotors, wohingegen sowohl MRE1.3-SNP1 als auch MRE1.3-SNP2 eine signifikant reduzierte MR/Aldosteron-abhängige Aktivierbarkeit (ca. 2-fach) zeigten (Abb. 25/C).

Um zellspezifische Effekte auszuschließen, wurden die Reporter-Gen-Assays in OK-Zellen wiederholt. Auch in diesen Zellen konnte die stark reduzierte MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung der MRE1.3-SNP1- und MRE1.3-SNP2-Varianten bestätigt werden. Während MRE1.3 in diesem Zelltyp eine 25-fache Steigerung der EGFR-Promotoraktivität nach Inkubation mit Aldosteron zeigte, konnten MRE1.3-SNP1 und MRE1.3-SNP2 lediglich 5-fach bzw. 4-fach in ihrer Aktivität erhöht werden (Abb. 26/A+C). Für MRE1.3-SNP1 war in den OK-Zellen ebenfalls nachzuweisen, dass die Grundaktivität dieses Promotorelementes doppelt so hoch ist wie die des MRE1.3. Die Basalaktivität des MRE1.3-SNP2 ist um das 1,5-fache der MRE1.3-Promotoraktivität erhöht (Abb. 26/B).

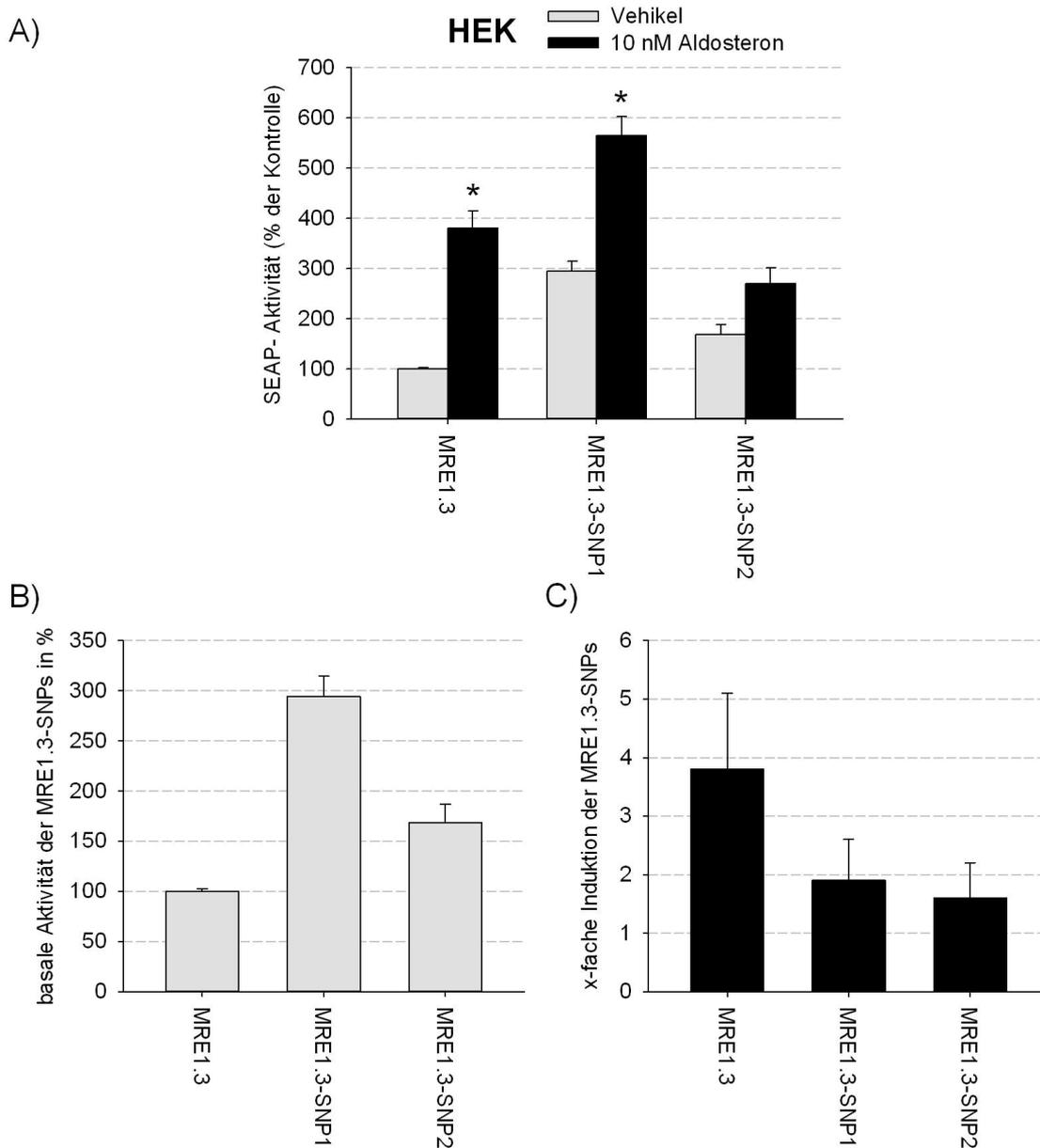


Abb. 25: Aldosteron-induzierte Aktivierbarkeit der verschiedenen MRE1.3-Promotorelemente in HEK293-Zellen. A) In mit hMR und MRE1.3, MRE1.3-SNP1 oder MRE1.3-SNP2 co-transfizierten und mit DMSO oder 10 nM Aldosteron inkubierten HEK293-Zellen, zeigen MRE1.3-SNP1 sowie MRE1.3-SNP2 im Vergleich zu MRE1.3 eine deutliche Reduktion der Aldosteron-abhängigen Promotoraktivierung. B) Die Basalaktivität des MRE1.3-SNP1-Promotorelements ist doppelt so hoch wie die des MRE1.3, die Grundaktivität des MRE1.3-SNP2-Promotors ist um das 1.5-fache erhöht. C) Im Vergleich der Aldosteron-induzierten Aktivierung zeigt lediglich MRE1.3 eine starke MR-abhängige EGFR-Promotoraktivierung, während für die beiden SNP-Varianten eine geringe Aktivierung nachgewiesen wurde (N=3; n=6-9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05).

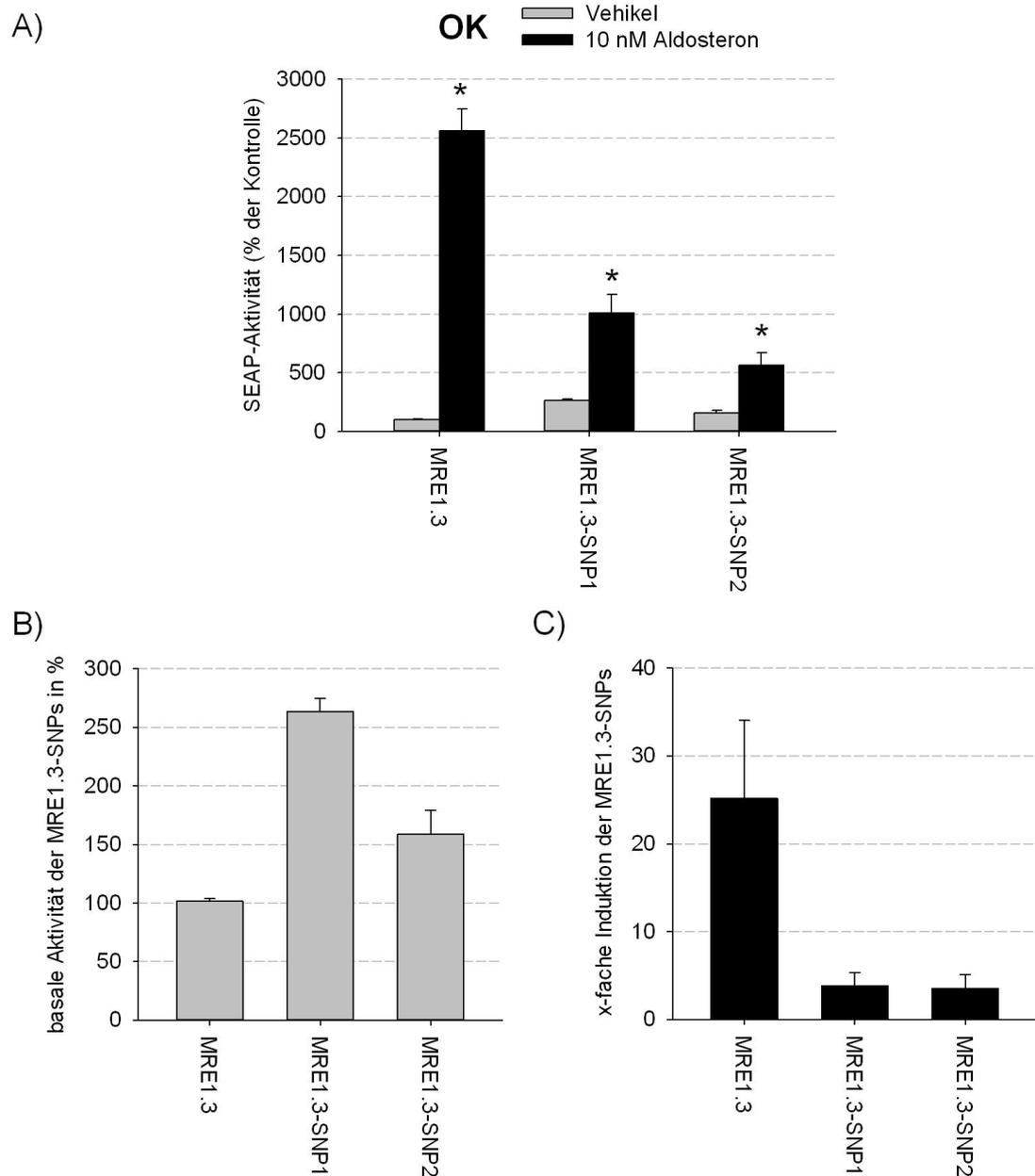


Abb. 26: Aldosteron-induzierte Reaktivierbarkeit der verschiedenen MRE1.3-Promotorelemente in OK-Zellen. A) Mit hMR transient transfizierte OK-Zellen wurden mit MRE1.3, MRE1.3-SNP1 oder MRE1.3-SNP2 co-transfiziert und anschließend mit DMSO oder 10 nM Aldosteron inkubiert. Sowohl MRE1.3-SNP1 als auch MRE1.3-SNP2 zeigen im Vergleich zu MRE1.3 eine deutliche Reduktion der Aldosteron-abhängigen Promotoraktivierung. B) Die Basalaktivität des MRE1.3-SNP1-Promotorelements ist doppelt so hoch wie die des MRE1.3, die Grundaktivität des MRE1.3-SNP2-Promotors ist um das 1.5-fache erhöht. C) Der Vergleich der Aldosteron-induzierten Aktivierung der verschiedenen Promotorelemente zeigt, dass MRE1.3 eine starke MR-abhängige EGFR-Promotoraktivierung aufweist, während für die beiden SNP-Varianten eine geringe Aktivierung nachgewiesen wurde (N=3; n=6-9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

3.5.1.4. SP1-Hemmung durch chemischen Inhibitor

Auf Grund der, verglichen mit MRE1.3, weniger starken Induzierbarkeit der MRE1.3-SNP1- und MRE1.3-SNP2-Promotorelemente nach Stimulation mit Aldosteron sowie der Resultate aus den Studien zur Bindung an SP1 aus Zellkernextrakten, sollte die Bedeutung von SP1 für die Aldosteron-abhängige Promotoraktivierung untersucht werden. Hierfür wurden Reporter-Gen-Assays in mit hMR und MRE1.3 (-216 T/T; -191 C/C), MRE1.3-SNP1 (-216 G/G; -191 A/A) oder MRE1.3-SNP2 (-216 G/G; -191 C/C) co-transfizierten OK-Zellen durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 48 h mit DMSO oder 10 nM Aldosteron sowie jeweils mit oder ohne den spezifischen SP1-Inhibitor WP631. OK-Zellen, die mit 10 nM Aldosteron inkubiert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen unter Kontrollbedingungen mit DMSO eine 11-fache Aktivierung des MRE1.3-Promotorelements. Die zusätzliche Inkubation mit dem Inhibitor WP631 führte zur signifikanten Hemmung der Aldosteron-induzierten Promotoraktivität. Unter Verwendung der EGFR-Promotorelemente MRE1.3-SNP1 und MRE1.3-SNP2 konnte nach Inkubation mit Aldosteron lediglich eine 2-fache Steigerung der SEAP-Reporter-Genaktivität gemessen werden. Eine Inkubation mit WP631 führte ebenfalls zur Hemmung der Aldosteron-abhängigen Promotoraktivierung (Abb. 27). Es konnte nachgewiesen werden, dass SP1 auch für die beiden Varianten MRE1.3-SNP1 und -SNP2 als Kofaktor für die MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung des Promotors eine entscheidende Rolle spielt, auch wenn die Effekte im Vergleich zu MRE1.3 wesentlich schwächer sind.

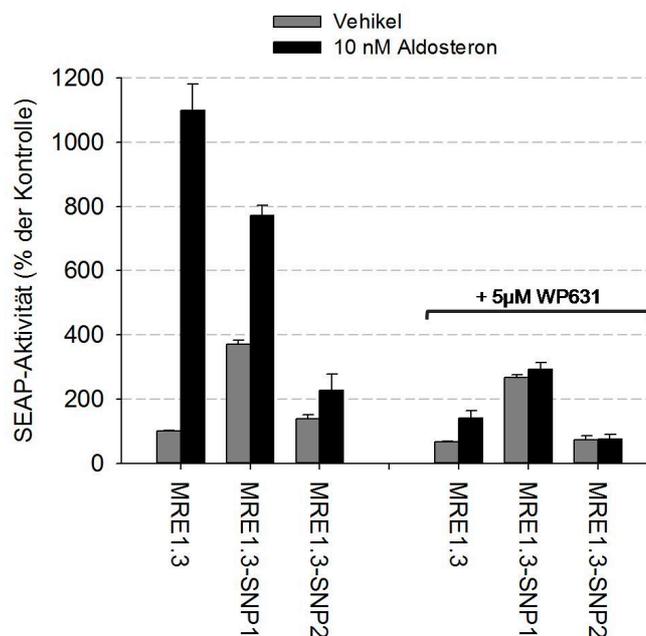


Abb. 27: SP1 als bedeutender Kofaktor der Aldosteron-induzierten EGFR-Promotoraktivierung. SEAP-Reporter-Gen-Assays in OK-Zellen zeigen, dass die Stimulation mit 10 nM Aldosteron zur Steigerung der Promotoraktivität führt, wobei MRE1.3-SNP1 und MRE1.3-SNP2 im Vergleich zu MRE1.3 weniger stark aktiviert werden. Inkubation der transienten OK-Zellen mit dem SP1-Inhibitor WP631 führt unabhängig des SNPs zur Hemmung der Aldosteron-abhängigen EGFR-Promotoraktivierung (N=3; n=6-9; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05).

3.5.2. Korrelation der verschiedenen *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) des EGFR-Promotors mit dem Auftreten renokardiovaskulärer Erkrankungen

3.5.2.1. CARLA- und SHIP-Kohortenstudien

Auf Grund der unterschiedlichen basalen und MR/Aldosteron-abhängigen Aktivierung der verschiedenen Varianten des MRE1.3-Promotorelements sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein eines bestimmten *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) mit einer Prävalenz für pathophysiologische Veränderungen bzw. Erkrankungen des renokardiovaskulären Systems einhergeht. Hierfür wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Alexander Kluttig aus dem Institut für Medizinische Epidemiologie (MLU Halle-Wittenberg) die CARLA-Studie sowie in Kooperation mit Herrn Dr. Marcus Dörr aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin (Universität Greifswald) die SHIP-Studie hinsichtlich verschiedener Parameter kardiovaskulärer Erkrankungen in Korrelation mit den MRE1.3-SNPs ausgewertet. Bei CARLA (**C**ardiovascular Disease, **L**iving and **A**geing in Halle) und SHIP (**S**tudy of **H**ealth in **P**omerania) handelt es sich um bevölkerungsbezogene Kohortenstudien mit Fokus auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, in denen Zusammenhänge zwischen der Prävalenz bestimmter Erkrankungen und ihrer Risikofaktoren untersucht werden sollen. Zu diesem Zweck wurden medizinische Parameter sowie verschiedene soziokulturelle Faktoren von insgesamt 3215 CARLA-Probanden im Alter zwischen 45 und 83 Jahren sowie 6265 SHIP-Probanden im Alter zwischen 20 und 79 Jahren erhoben. Weiterhin erfolgte eine Genotypisierung der Probanden, sodass eine Korrelation der MRE1.3-SNPs mit dem Auftreten renokardiovaskulärer Erkrankungen untersucht werden konnte. Eine vollständige Liste der ausgewählten Parameter sowie die vollständige Auswertung kann im Anhang (B1.2 sowie B1.3) eingesehen werden. Da MRE1.3-SNP2 (-216 G/-; -191 C/-) die Variante des EGFR-Promotors ist, welche am häufigsten, z.T. sogar als einzige Variante, in den verschiedenen Populationen der Weltbevölkerung auftritt (siehe Anhang B1.1), diente dieser SNP in den Analysen als Standard, sodass die Daten für MRE1.3 (-216 T/-; -191 C/-) sowie MRE1.3-SNP1 (-216 G/-; -191 A/-) mit diesem verglichen wurden. Abweichungen der Anzahl an Probanden von der Gesamtzahl der Studienteilnehmer entstehen durch verschiedene Einschränkungen in der Erhebung. So mußten Patienten ausgeschlossen werden, die auf Grund medikamentöser Behandlung keine Symptome bzw. Parameter kardiovaskulärer Erkrankungen aufwiesen oder am Ende des Erhebungszeitraumes nicht wieder zur Verfügung standen. Von den ausgewählten medizinischen Parametern konnte in beiden Studien eine Korrelation des Auftretens von Vorhofflimmern mit dem MRE1.3-Promotorelement nachgewiesen werden. So war die Wahrscheinlichkeit (dargestellt durch die *Odds Ratio*), an Vorhofflimmern zu erkranken, für eine Person mit der MRE1.3-Variante ungefähr 2,2-mal (CARLA) bzw. 2-mal (SHIP) so hoch verglichen mit Trägern des MRE1.3-SNP2. Im Gegensatz dazu lag die Wahrscheinlichkeit,

an Vorhofflimmern zu erkranken, für Probanden mit MRE1.3-SNP1 im Vergleich zu -SNP2 bei ca. 0,89 (CARLA) bzw. 0,65 (SHIP) (Tab. 15).

Tab. 15: Korrelation der verschiedenen MRE1.3-SNPs mit dem Auftreten von Vorhofflimmern.

Studie	SNP	Parameter	Anzahl Probanden	Odds Ratio	Unteres Limit des Konfidenzintervalls (95%)	Oberes Limit des Konfidenzintervalls (95%)
CARLA	MRE1.3	Vorhofflimmern	778	2.184	0.456	10.451
	MRE1.3-SNP1		773	0.888	0.165	4.781
SHIP	MRE1.3	Vorhofflimmern	3528	2.052	1.239	3.398
	MRE1.3-SNP1		3528	0.654	0.405	1.057

Es lässt sich zusammenfassen, dass das EGFR-Promotorelement MRE1.3 eine deutliche MR/Aldosteron-induzierte, SP1-abhängige Aktivierung des Promotors zeigte, wohingegen MRE1.3-SNP1 und -SNP2 im Vergleich zu MRE1.3 nur sehr schwach durch den Aldosteron-gebundenen MR aktiviert wurden. Demnach korreliert das erhöhte Risiko, an Vorhofflimmern zu erkranken, mit einer starken Aktivierbarkeit durch den MR/Aldosteron-abhängigen Mechanismus der MRE1.3-EGFR-Promotoraktivierung. Im Gegensatz dazu lässt sich die Variante mit der höchsten basalen EGFR-Promotoraktivität und geringer Aldosteron-abhängiger Induktion, nämlich MRE1.3-SNP1, mit einer geringeren Prävalenz für Vorhofflimmern in Zusammenhang bringen. Auch für das MRE1.3-SNP2-Element, welches verglichen mit MRE1.3 ebenfalls eine höhere Basalaktivität und eine deutlich geringere MR-abhängige Aktivierbarkeit aufweist, zeigte sich eine geringere Wahrscheinlichkeit, an Vorhofflimmern zu erkranken.

3.5.2.2. Identifikation potenzieller Ionenkanäle, die in das Entstehen von Vorhofflimmern involviert sein können

RT² Profiler PCR Arrays von murinen Ionenkanälen

Als Vorhofflimmern bezeichnet man eine vorübergehende (paroxysmale) oder dauerhafte (permanente) Herzrhythmusstörung, die durch eine veränderte Erregungsleitung der Herzvorhöfe bedingt wird. Da Ionenkanäle eine entscheidende Rolle bei der Erregungsleitung an Nerven- und Muskelzellen spielen, kann eine veränderte Expression oder Regulation bestimmter Ionenkanäle ursächlich für die Entstehung von Vorhofflimmern sein. Basierend auf den Ergebnissen aus den EGFR-Promotorstudien und der gezeigten Korrelation der verschiedenen SNPs mit der Prävalenz für Vorhofflimmern sollten anhand von RT² Profiler PCR Arrays an Herzgeweben von EGFR-Knock-out-Mäusen (EGFR-KO-Mäuse) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (EGFR-WT), in den Mechanismus involvierte Ionenkanäle identifiziert werden. Die verwendeten EGFR^{ΔΔVSMC}-Tiere zeigen im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen (EGFR^{+/+VSMC}) in isolierten Kardiomyozyten eine Reduktion der EGFR-mRNA-Expression sowie der EGFR-Proteinmenge auf ein Niveau von $41 \pm 13\%$, wohingegen keine Expressionsveränderungen in Leber, Niere und Lunge zu detektieren waren [190,191]. Im gesamten Herzen, welches neben den Kardiomyozyten zusätzlich aus Fibroblasten besteht, konnte die EGFR-Expression um ein Drittel reduziert werden [190,191]. Für die Analysen wurden Arrays mit Primern für neuronale Ionenkanäle der Maus verwendet, die größtenteils ebenfalls im Herzen exprimiert werden. Im einzelnen Array war es möglich, das Herzgewebe von jeweils 2 *Knock-out*- und 2 Wildtyp-Tieren miteinander zu vergleichen. So wurden pro Array 83 verschiedene Ionenkanäle analysiert und diese auf 5 *Housekeeping*-Gene bezogen (Auflistung siehe Anhang A3.2).

Abbildung 28 stellt die mittleren ddct (WT-KO)- Werte sowie Konfidenzintervalle der mittels RT² Profiler PCR Arrays analysierten Ionenkanäle gegenüber. Anhand dieser statistischen Methode konnten verschiedene Ionenkanäle identifiziert werden, die sich in ihrer Expression in EGFR-WT- und EGFR-*Knock-out*-Tieren signifikant unterscheiden. So lässt sich für die Gene, *Cacna1c* (Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit), *Cacna1g* (Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit), *Cacnb2* (Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit), *Clnc3* sowie *Clnc7* (Chloride channel, voltage-sensitive 3 und 7), *Hcn2* (Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated potassium channel 2), *Kcnd2* und *Kcnd3* (Potassium voltage-gated channel subfamily D member 2 und 3), *Kcnj12* sowie *Kcnj13* (Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12 und 13), *Scn10a* (Sodium channel, voltage-gated, type X, alpha), *Scn8a* (Sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha), *Scn2a1* (Sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1) und *Trpm2* (Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2) in den EGFR-*Knock-out*-Tieren eine verringerte Expression verglichen mit den EGFR-Wildtyp-Mäusen nachweisen (rot markiert). Weiterhin zeigen die EGFR-*Knock-out*-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gesteigerte Expression der Ionenkanäle *Accn3* (Amiloride-sensitive cation channel 3), *Cacna1b* (Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit, neuronal), *Cacna1i* (voltage-gated calcium channel subunit 1i), *Kcnc1* (Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 1), *Kcnh1* (Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 1), *Kcnj1* (Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 1), *Kcnmb4* (Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4), *Kcnn3* (Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3), *Trpc1*, *Trpc3* sowie *Trpc6* (Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1, 3 und 6), *Trpm1*, *Trpm6* sowie *Trpm8* (Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1, 6 und 8), *Trpv2*, *Trpv3* und *Trpv4* (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 2, 3 und 4) (blau markiert).

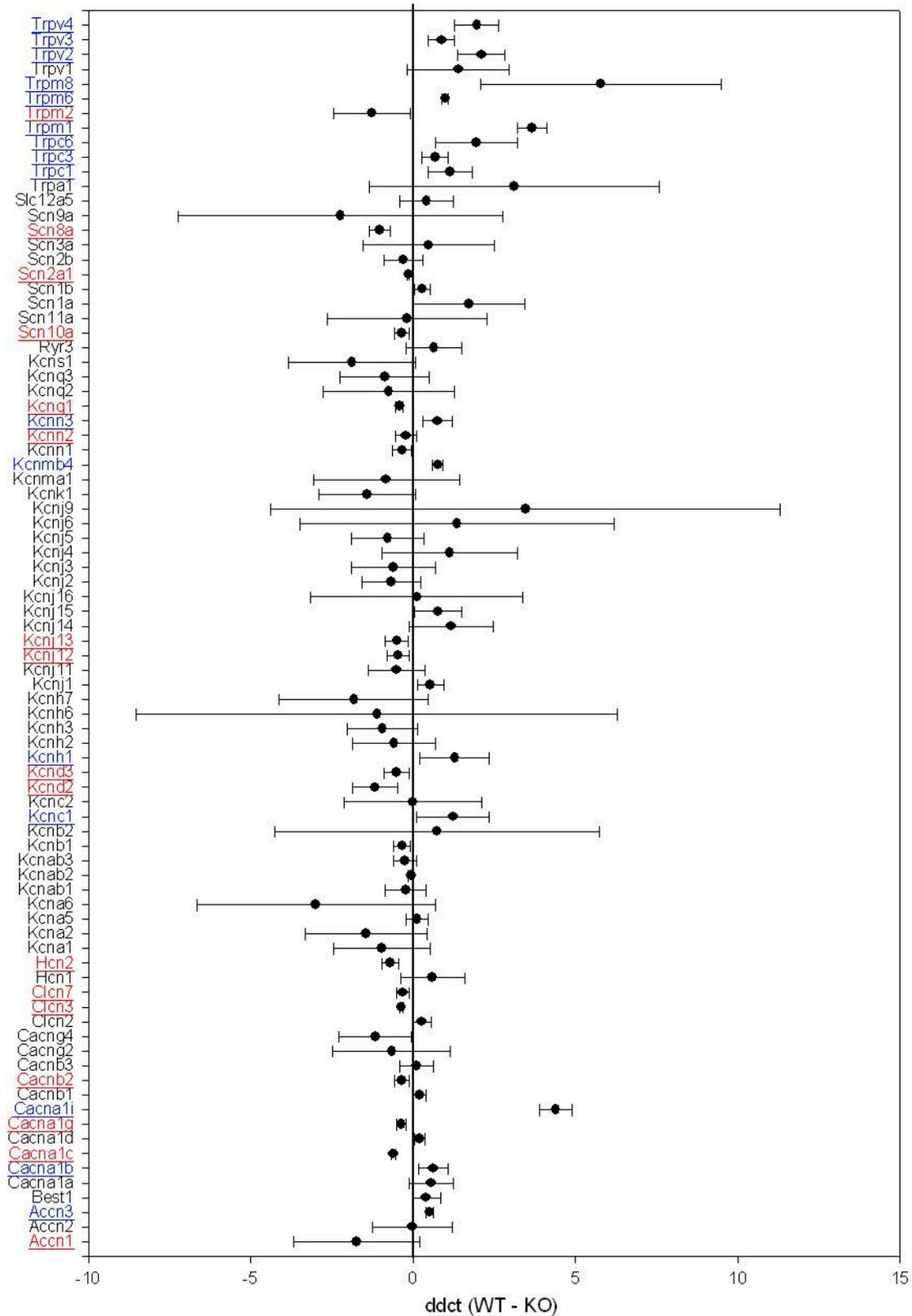


Abb. 28: Expression verschiedener Ionenkanäle des Herzens in EGFR-KO-Mäusen im Vergleich zu EGFR-KO-Mäusen. Dargestellt werden die mittleren ddct (WT-KO)-Werte sowie die Konfidenzintervalle. Ionenkanäle, die eine signifikante Veränderung in ihrer Expression in EGFR-Knock-out-Tieren zeigen, wurden farbig markiert (N=2; n=8; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM).

Vergleicht man die Mittelwerte der aus den RT² PCR Arrays erhaltenen CT-Werte sowie die entsprechenden Konfidenzintervalle von EGFR-Wildtyp-Mäusen und EGFR-*Knock-out*-Mäusen, so überlagern sich die Intervalle für einen Großteil der analysierten Ionenkanäle, und die einzelnen Werte innerhalb der Gruppen variieren teilweise sehr stark (siehe Anhang B2.1), sodass ein großer Teil der oben genannten Ionenkanäle für die weiteren Untersuchungen nicht in Betracht gezogen wurde. Der Ionenkanal Accn1 (Amiloride-sensitive cation channel 1), welcher laut PCR Arrays in den EGFR-*Knock-out*-Mäusen weniger stark exprimiert war, wurde ebenfalls in die weitere Validierung einbezogen, da die Konfidenzintervalle der mittleren CT-Werte (siehe Anhang B2.1) nicht überlagern und die Signifikanz mit höherer Stichprobenanzahl erneut validiert werden sollte. Von den 34 putativen Kandidaten erfolgte eine Auswahl der Gene, die eine signifikante Veränderung in ihrer Expression zeigten und dabei entweder keine Überlappung der Konfidenzintervalle der mittleren CT-Werte zeigen (Accn1, Cacna1i, Trpm8, Trpv2) und/oder für den untersuchten Mechanismus der Entstehung von Vorhofflimmern relevant sein könnten (Cacna1c, Cacna1g, Trpv4, Kcnn2, Clnc3, Clnc7, Trpm1). Weiterhin wurde der Ionenkanal Cacna1h (Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit) in die Analysen einbezogen und dessen Expressionsunterschiede untersucht, da dieser mit Cacna1i und Cacna1g zusammenwirkt, jedoch nicht auf dem RT² Profiler PCR Array integriert war.

Validierung der putativen Ionenkanäle mittels RT-qPCR

Eine Validierung der ausgewählten Ionenkanäle erfolgte anhand von RT-qPCR-Analysen an cDNA aus EGFR-*Knock-out*-Mäusen im Vergleich zu EGFR-Wildtyp-Mäusen. Hierfür wurde RNA aus den Herzen von je 5 männlichen Wildtyp- und je 6 männlichen *Knock-out*-Tieren verwendet und nach Reverser Transkription die Genexpression in den beiden Versuchsgruppen miteinander verglichen. Als Referenz für ein nicht verändert exprimiertes Gen diente die ribosomale 18S-RNA, die zur Normierung der CT-Werte verwendet wurde. Da sich die CT-Werte in den qPCR-Analysen für die Ionenkanäle Trpm1 und Trpm8 sowohl in EGFR-WT als auch EGFR-KO-Mäusen an der Nachweisgrenze befanden, konnten diese in der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Abbildung 29 stellt die Veränderung der ddct-Werte sowie die x-fache Veränderung der Expression der Ionenkanäle in den Herzen der EGFR-*Knock-out*-Mäuse im Vergleich zu EGFR-Wildtyp-Mäusen dar ($MW(ddct)^{WT} = 0$; $MW(2^{ddct})^{WT} = \pm 1$). Von den ausgewählten Ionenkanälen zeigten der Amilorid-sensitive Kationenkanal 1 (Accn1), der TRP-Kationenkanal Trpv4 sowie der Spannungs-abhängige Chloridkanal 7 (Clnc7) eine signifikante Steigerung der Expression, wohingegen die Expression des T-Typ-Calciumkanals Cacna1h in den *Knock-out*-Tieren signifikant reduziert war. Alle anderen Gene zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Im Vergleich zu den Ergebnissen aus den Arrays konnte mittels qPCR eine gesteigerte Accn1-Expression in den Herzen der EGFR-*Knock-out*-Mäuse

nachgewiesen werden, wohingegen die *Accn1* in den Arrays eine niedrigere Expression nach *EGFR-Knock-out* im Vergleich zum Wildtyp zeigte.

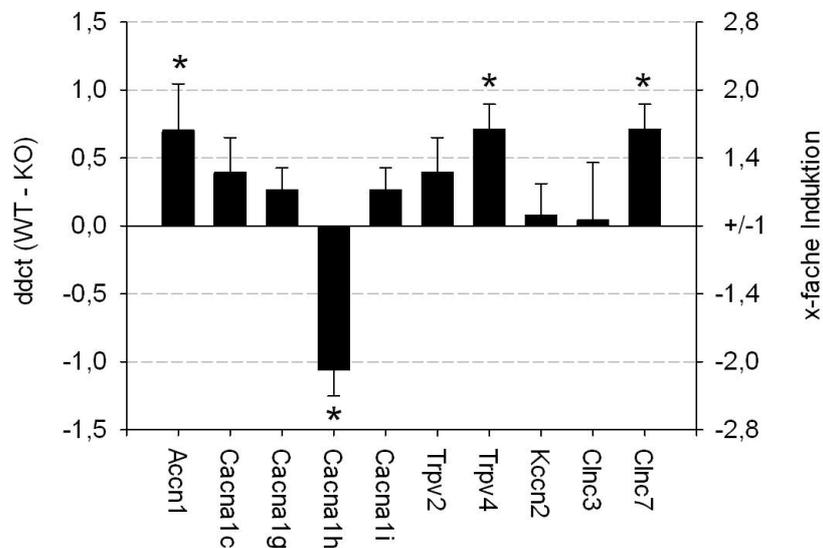


Abb. 29: Validierung der Ionenkanäle mittels qPCR in Herzgewebe. *EGFR-Knock-out*-Mäuse zeigen im Vergleich zu *EGFR-Wildtyp*-Mäusen im Herzen eine gesteigerte *Accn1*-, *Trpv4*- sowie *Clnc7*-Expression, wohingegen eine Reduktion der *Cacna1h*-Expression vorliegt (N=5-6; n=10-12; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$).

Herzgewebe setzt sich, wie bereits erwähnt, aus Kardiomyozyten und Fibroblasten zusammen. Da die Expression des EGFR auf mRNA- und Proteinebene in *EGFR-Knock-out*-Mäusen in Kardiomyozyten bei 41% des Expressionsniveaus von Wildtyp-Tieren (EGFR-Expression im Herz bei 66% des Wildtyp-Niveaus) vorliegt, erfolgte die weitere Validierung der ausgewählten Ionenkanäle in Kardiomyozyten. Abbildung 30/A stellt die Veränderung der ddct-Werte sowie die x-fache Veränderung der Expression der Ionenkanäle in den Kardiomyozyten der *EGFR-Knock-out*-Mäuse (11 Tiere) im Vergleich zu *EGFR-Wildtyp*-Mäusen (10 Tiere) dar ($MW(ddct)^{WT} = 0$; $MW(2^{ddct})^{WT} = \pm 1$). Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Herzen konnte in den Kardiomyozyten zusammenfassend eine signifikante Reduktion des Amilorid-sensitiven Kationenkanals *Accn1*, der Spannungsgesteuerten T-Typ-Calciumkanäle *Cacna1c*, *Cacna1g*, *Cacna1h* sowie *Cacna1i*, der TRP-Kationenkanäle *Trpv2* und *Trpv4* sowie des Spannungs-abhängigen Chloridkanals *Clnc3* nachgewiesen werden. Hierbei wurden die stärksten Effekte für *Accn1* (ca. 64-fache Reduktion), *Cacna1h* (ca. 4-fache Reduktion) sowie *Clnc3* (ca. 8-fache Reduktion) detektiert. Weiterhin konnte eine signifikante ca. 4-fache Steigerung der Expression des Spannungs-abhängigen Chloridkanals *Clnc7* nachgewiesen werden.

Um eventuelle geschlechtsspezifische Effekte zu untersuchen, erfolgte eine getrennte Auswertung der Daten aus den qPCRs an Kardiomyozyten nach männlichen und weiblichen

Tieren. So konnten im Fall der männlichen Tiere jeweils 5 EGFR-*Knock-out*-Mäuse mit 4 EGFR-Wildtypen (Abb. 30/B) und im Fall der weiblichen Tiere 5 EGFR-Wildtyp- sowie 6 EGFR-*Knock-out*-Mäuse miteinander verglichen werden. (Abb. 30/C). Zusammenfassend kann ein geschlechtsspezifischer Effekt des EGFR-*Knock-outs* auf die Expression der untersuchten Ionenkanäle ausgeschlossen werden. Kardiomyozyten zeigen in männlichen und weiblichen Tieren sowohl in den EGFR-*Knock-out*- als auch EGFR-Wildtyp-Mäusen identische Expressionsmuster. Im Fall von *Accn1* zeigt sich zusätzlich ein signifikanter Unterschied in der Intensität der Expressionsänderung. So sinkt die *Accn1*-Expression in Kardiomyozyten männlicher Tiere um das 16-fache, wohingegen eine 256-fache Reduktion in weiblichen Tieren auftrat (Abb. 30/B+C).

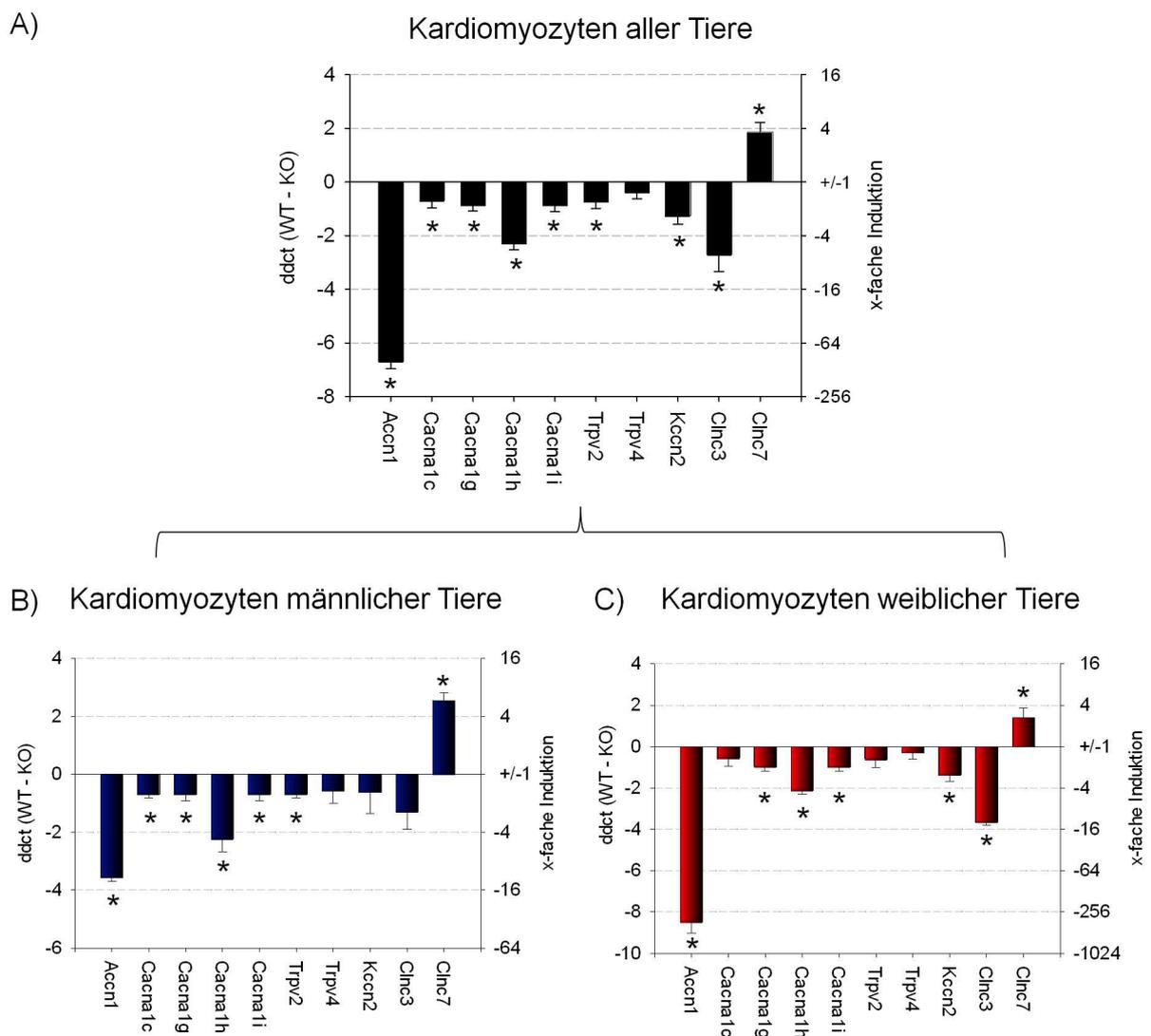


Abb. 30: Validierung der Ionenkanäle in Kardiomyozyten. EGFR-*Knock-out*- zeigen im Vergleich zu EGFR-Wildtyp-Mäusen in Kardiomyozyten eine verminderte *Accn1*-, *Cacna1c*-, *Cacna1g*-, *Trpv2*- sowie *Cln3*-Expression sowie eine Steigerung der *Cln7*-Expression (N=5-6; n=10-12; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$). Hierbei unterscheiden sich die geschlechtsspezifischen Expressionsmuster nicht signifikant (N_{männlich}=3-4, n=6-8; N_{weiblich}=3-4, n=6-8).

Untersuchungen zur Aldosteron-Abhängigkeit der Veränderungen der Ionenkanalexpression

Die mittels qPCR validierten Ionenkanäle, welche eine Rolle bei der Entstehung von Vorhofflimmern spielen könnten, sollten in einem Folgeexperiment anhand von RNA aus Herzen von EGFR-WT- und EGFR-KO-Mäusen nach Behandlung mit Aldosteron/NaCl hinsichtlich ihrer Expression charakterisiert werden. Hierbei kann durch den Vergleich mit EGFR-WT- und EGFR-KO-Tieren ohne Aldosteron-Behandlung eine Unterscheidung zwischen EGFR-abhängigen und EGFR-unabhängigen Aldosteron-Effekten hinsichtlich der Expressionsänderung vorgenommen werden. Für die Analyse wurde RNA aus den Gesamtherzen von jeweils 4-6 männlichen und 4-6 weiblichen Tieren pro Versuchsgruppe verwendet. Verglichen werden die ddct-Werte sowie die x-fache Induktion nach Aldosteron-Behandlung von EGFR-WT- und EGFR-KO-Mäusen mit unbehandelten Kontrolltieren beider Genotypen ($ddct^{\text{Kontrolle}}=0$; $x\text{-fache Induktion}^{\text{Kontrolle}}= +/-1$). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Expression von Trpv4 sowohl in den EGFR-WT- als auch EGFR-KO-Mäusen signifikant durch Aldosteron gesteigert wird. Es handelt sich hierbei um Aldosteron-Effekte, die EGFR-unabhängig vermittelt werden. Im Gegensatz dazu war eine signifikante Expressionssteigerung von Accn1, Cacna1c, Cacna1g, Cacna1h sowie Trpv2 nur in den EGFR-WT-Tieren nachzuweisen (Abb. 31). Es handelt sich hierbei jeweils um EGFR-abhängige Aldosteron-Effekte. Ferner konnte mit Kcnn2 ein Aldosteron-abhängiger EGFR-unabhängiger Ionenkanal identifiziert werden, welcher nur in den EGFR-KO-Mäusen nach Aldosterongabe überexprimiert wurde.

Auf Grund der experimentellen Vorbefunde hinsichtlich der Induzierbarkeit des EGFR-Promotors durch Aldosteron-aktivierten MR sowie der Ergebnisse aus den klinischen Studien CARLA und SHIP sind die Ionenkanäle besonders interessant, die in Abhängigkeit des EGFR durch Aldosteron induziert werden können. Da die pathophysiologische Relevanz von Calciumkanälen für die Entstehung von Vorhofflimmern bereits in der Literatur beschrieben wurde [194–197], soll der Fokus zukünftiger Untersuchungen zunächst auf den identifizierten T-Typ-Calciumkanälen Cacna1g, Cacna1h und Cacna1i liegen.

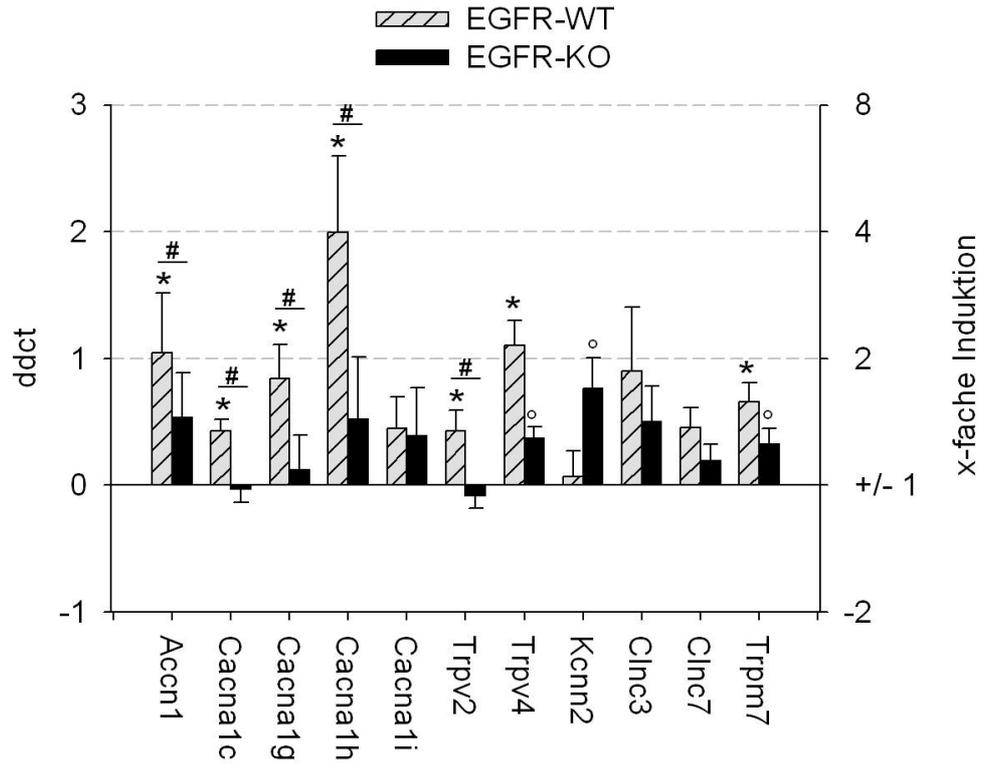


Abb. 31: Einfluss von Aldosteron auf das Expressionsmuster der Ionenkanäle in EGFR-WT- und EGFR-KO-Tieren. Die Gabe von Aldosteron führt in Herzen von EGFR-WT-Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der Expression von *Accn1*, *Cacna1c*, *Cacna1g*, *Cacna1h*, *Trpv2* sowie *Trpv4* (*) sowie in Herzen von EGFR-KO-Tieren zu einer signifikant erhöhten Expression von *Trpv4* und *Kcnn2* (°). EGFR-abhängig reguliert werden *Accn1*, *Cacna1c*, *Cacna1g* + *1h* sowie *Trpv2* (#) (N=4-6; n=8-12; Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM; *p \leq 0,05).

4. Diskussion

Der EGFR spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse wie zum Beispiel fetaler Entwicklung, Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen sowie bei der Einstellung des Gefäßtonus. Desweiteren dient der Rezeptor als Angriffsziel verschiedener Inhibitoren im Rahmen der Krebs-Therapie. Es ist außerdem bekannt, dass der EGFR unter bestimmten Voraussetzungen die pathologische Vermehrung von Bindegewebszellen (Fibrose) im renokardiovaskulären System fördert [198–200]. Die Aktivierung des EGFR kann hierbei durch extrazelluläre Liganden oder Transaktivierungsmechanismen anderer Signalwege erzielt werden. Durch eine Transaktivierung des EGFR bedingte Gewebeveränderungen wurden sehr detailliert für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie z.B. den Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor oder den Endothelin-1-Rezeptor beschrieben [199,201,202]. Die ersten Hinweise für eine Interaktion des MR mit der EGFR-Signalkaskade gehen auf Untersuchungen an Aorta, Koronargefäßen und Gehirnschnitten der Ratte zurück. Hier konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Mineralokortikoiden auf der einen Seite zu Kontraktionen, Fibrose sowie Remodeling von Gefäßen und auf der anderen Seite zur Steigerung der Expression des EGFR führten [10–12]. Eine Interaktion des MR und des EGFR wurde sowohl für einen nicht-genomischen, transaktivierenden Mechanismus [100,155] als auch einen genomischen Weg mittels veränderter Genexpression nachgewiesen [156,158]. So bestätigen verschiedene Forschungsgruppen eine MR-abhängige Steigerung der EGFR-Expression in Herz, Aorta und Nieren [10,156,158–160]. Die Identifikation des MRE1.3-Elements auf dem EGFR-Promotor [157,193] ermöglicht es, den Mechanismus der Interaktion zwischen MR und EGFR näher zu charakterisieren und daraus resultierend weitere MR-spezifische responsive Elemente zu identifizieren, die keine klassischen GRE-Elemente enthalten.

4.1. Charakterisierung der Interaktion zwischen MR und EGFR-Promotor

4.1.1. SP1 als Kofaktor der MR/Aldosteron-induzierten EGFR-Promotoraktivierung

SP1 bindet spezifisch an das MRE1.3-Promotorelement

Eine Interaktion des MR und des EGFR-Promotors in HEK293-Zellen wurde in früheren Arbeiten mittels Chromatinimmunopräzipitation und Transkriptionsfaktor-ELISAs mit Zellkernextrakten in unserer Arbeitsgruppe beschrieben [156]. Im Rahmen dieser Promotion konnte in weiteren Transkriptionsfaktor-ELISA-Experimenten erstmals gezeigt werden, dass *in vitro* synthetisierter MR nicht alleine an das EGFR-Promotorelement binden kann, sondern nur MR aus nukleären Extrakten eine spezifische Bindung an MRE1 aufweist [157]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die MR-EGFR-Promotor-Interaktion einen oder mehrere zusätzliche Kofaktoren benötigt. Die im Rahmen dieser Promotion durchgeführte *in silico* Suche nach Interaktionspartnern identifizierte drei putative Bindemotive für den

Transkriptionsfaktor SP1, dessen Bindung durch anschließende EMSAs tatsächlich validiert werden konnte. Hierbei bindet die biotinylierte MRE1.3-Sonde sowohl an rekombinantes humanes SP1 als auch an SP1 aus nukleären Extrakten. Der Transkriptionsfaktor SP1 erkennt GC-reiche Promotorsequenzen, die, wie der EGFR-Promotor, keine TATA-Box enthalten [203]. Die Spezifität der Bindung konnte anhand der Verwendung der spezifischen SP1-Konsensussequenz als Positivkontrolle sowie anderer Sonden und BSA als Negativkontrolle bestätigt werden. Anschließende ELISA-Experimente zeigten, dass *in vitro* synthetisierter MR in Anwesenheit von rekombinantem SP1 zu einer Steigerung der Bindungsaffinität an das Mineralokortikoid-responsive Element führt. Die Spezifität dieser Interaktion wurde durch die Wiederholung der Experimente mit *in vitro* synthetisiertem Glukokortikoidrezeptor bekräftigt, da hier weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von rekombinantem SP1 eine Änderung der Bindungsaffinität an die Sonde detektiert werden konnte [157]. Trotz der *in silico* Annotation von drei putativen SP1-Bindemotiven auf dem 65 bp langen MRE1.3-Promotorelement (-228 bis -163) ließ sich nur das im 5'-Bereich liegende Bindemotiv innerhalb der MRE1.3a-Sequenz (-228 bis -208) als tatsächliche Bindestelle bestätigen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Resultaten von Schuch et al. überein, die mittels Chromatinimmunopräzipitation die Bindung von SP1 an eine dem MRE1.3a-Element adäquate EGFR-Promotorsequenz nachweisen konnten [204]. Bereits 1987 identifizierten Kageyama, Merlino und Pastan mit Hilfe von Experimenten zur *in vitro* Transkription des EGFR-Proto-Onkogens in nukleären Extrakten drei EGFR-Promotorregionen (a: -527 bis -384, b: -151 bis -105 und c: -05 bis -20), die Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1 enthalten, von denen sich die Regionen b und c als entscheidend für die *in vitro* Transkription erwiesen [205]. Die Bindung von SP1 an andere Regionen des EGFR-Promotors wurde in der Vergangenheit ebenfalls beschrieben. So zeigten Vaillan et al. im Jahr 1998, dass eine SP1-Bindung an den EGFR-Promotor in der Region -150 bis -16 bp erfolgt, wo es zusammen mit PML (Promyelocytic Leukemia Protein) interagiert und dadurch zu einer negativen Regulation des EGFR-Promotors führt [206]. Da es sich beim Transkriptionsfaktor SP1 um ein ubiquitär vorkommendes Protein handelt, welches in viele verschiedene zelluläre Prozesse, wie beispielsweise das Zellwachstum, die Differenzierung, die Apoptose oder Immunantwort involviert ist, überrascht es nicht, dass die SP1-abhängige Regulation des EGFR über eine Vielzahl an Interaktionspartnern wie dem MR oder PML stattfinden kann.

Die Verwendung weiterer biotinylierter Promotorsequenzen zeigte, dass lediglich die AP-1-Sonde ebenfalls spezifisch, aber wesentlich schwächer durch den Transkriptionsfaktor SP1 gebunden werden konnte. Beim Activator Protein-1 (AP-1) handelt es sich ebenfalls um einen ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl zellulärer Prozesse reguliert. Hierzu gehören genau wie bei SP1 die Proliferation und Differenzierung sowie die

Apoptose von Zellen. SP1 und AP-1 sind oftmals Ziele verschiedener Signaltransduktionskaskaden und werden durch Phosphorylierung aktiviert, um anschließend an die Zielpromotoren zu binden und so die Expression der entsprechenden Gene auszulösen. Gao et al. beschreiben einen synergistischen Wirkungsmechanismus von SP1 und AP-1 bei der Aktivierung des humanen VIL2-Gens (Villin 2, Ezrin) [207]. Es wäre daher denkbar, dass SP1 an den AP-1-Promotor bindet, um die Expression des Interaktionspartners zu regulieren bzw. zu verstärken. Vorangegangene Studien demonstrieren, dass die SP1/AP-1-Interaktion unabhängig von der Distanz der spezifischen Bindemotive beider Transkriptionsfaktoren ist. Ein postuliertes Modell für den synergistischen Mechanismus beschreibt eine durch SP1-Bindung vermittelte Konformationsänderung der DNA, die die Bindung von AP-1 an den Promotor begünstigt und so zur Aktivierung des Promotors führt [208,209]. Eine direkte Regulation von AP-1 durch SP1 wäre demnach denkbar, wurde aber nicht näher untersucht.

Mutationen innerhalb des SP1-Bindemotivs in MRE1.3 unterbinden die spezifische SP1-Bindung und verringern die MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung des Promotorelements

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 als Kofaktor der MR/Aldosteron-induzierten Aktivierung des EGFR-Promotors konnte zunächst anhand von gerichteten Mutationen des SP1-Bindemotivs innerhalb der MRE1.3-Sequenz verdeutlicht werden. So zeigten *Electromobility Shift Assays* mit biotinylierten mutierten Sonden (MRE1.3mut1 sowie MRE1.3mut2) und nukleären Extrakten aus hMR-transfizierten, mit 10 nM Aldosteron stimulierten HEK293-Zellen im Vergleich zu MRE1.3 keine spezifische Bindung an SP1. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass in Reporter-gen-Assays in HEK293- und OK-Zellen unter Verwendung der Promotorelemente MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2 im Vergleich zu MRE1.3 eine geringere Aktivierung des Reportergens nach Inkubation mit dem Liganden Aldosteron erzielt wird. Diese Aktivierung ist statistisch signifikant, verglichen mit den Ergebnissen aus den Analysen mit dem MRE1.3-Promotorelement jedoch deutlich reduziert. Das durch die Mutationen bedingte Fehlen einer spezifischen SP1-Bindung an die Promotorelemente MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2 führt demnach zu einer geringeren MR/Aldosteron-abhängigen Aktivierung des Reportergens. Dass es sich hierbei um zellspezifische Effekte handelt, konnte durch die Reproduzierbarkeit der Experimente in OK-Zellen ausgeschlossen werden.

MRE1.3 fungiert als Minimalpromotor der MR/Aldosteron-induzierten EGFR-Expression

Basierend auf der Sequenz des MRE1.3-responsiven Elements und der Identifikation des Interaktionspartners SP1 sollte im Folgenden der Minimalpromotor eingegrenzt werden, der notwendig ist, um eine MR-spezifische Regulation des EGFR zu bewirken. Hierfür wurden verschiedene MRE1.3-Deletionskonstrukte in Reporter-gen-Assays in hMR-transfizierten HEK293- sowie OK-Zellen getestet. Kürzere Promotorelemente konnten trotz Vorhandensein

des SP1-Bindemotivs keine signifikante Steigerung der Reporteraktivierung nach Inkubation mit Aldosteron im Vergleich zur Behandlung mit DMSO als Kontrolle erzielen. Dies verdeutlicht, dass die komplette 65 bp lange MRE1.3-Promotorsequenz als Minimalpromotor der MR/Aldosteron-induzierten EGFR-Aktivierung notwendig ist. Damit ist das Mineralokortikoid-responsive Element (MRE) deutlich größer als das 15 bp lange klassische Glukokortikoid-responsive Element (GRE), welches sowohl für den MR als auch GR als Zielsequenz verschiedener physiologischer Signalkaskaden bekannt ist. Die Größe des Minimalpromotors resultiert vermutlich aus den für die Interaktion des MREs mit dem MR und dem Transkriptionsfaktor SP1 oder verschiedenen anderen Kofaktoren notwendigen Bereichen. Eine Interaktion von SP1 mit anderen Steroidrezeptoren wurde bereits für den Glukokortikoidrezeptor, den Progesteronrezeptor und den Androgenrezeptor beschrieben, wobei bisher ungeklärt bleibt, welcher Natur die Interaktionen zwischen SP1 und diesen Rezeptoren ist [210–213]. Studien zum Östrogenrezeptor konnten außerdem zwei verschiedene Mechanismen der SP1-Interaktion zeigen. So können zum einen sowohl SP1 als auch der Östrogenrezeptor an die DNA binden oder zum anderen bindet SP1 alleine an die DNA und in dessen Folge der Östrogenrezeptor dann an SP1 [214–216]. Für eine Interaktion von MR und SP1 am MRE1.3-EGFR-Promotorelement sind ebenfalls mehrere Modelle denkbar, die in Abbildung 32 zusammengefasst werden. Eine Möglichkeit wäre, dass der MR und SP1 in direkter räumlicher Nähe an die DNA binden und hierbei entweder durch direkte Bindung interagieren oder ohne direkte Bindung der Proteine wechselwirken (Abb. 32/A). Vorstellbar wäre ebenfalls, dass SP1 an die DNA bindet und dadurch zu einer Konformationsänderung der 3D-Struktur des Promotorelements führt, was dann erst die MR-Bindung ermöglicht (Abb. 32/B). Alternativ wäre eine Bindung des MR an SP1 und eine anschließende Bindung an den EGFR-Promotor und die damit verbundene Modulation der Transkription vorstellbar (Abb. 32/C). Auf Grund der Notwendigkeit des kompletten 65 bp langen Promotorelements für den stimulatorischen Effekt des aktivierten MR, obwohl die Bindung des SP1 in der vorderen 25 bp Region stattfindet, erscheint Modell C momentan am unwahrscheinlichsten.

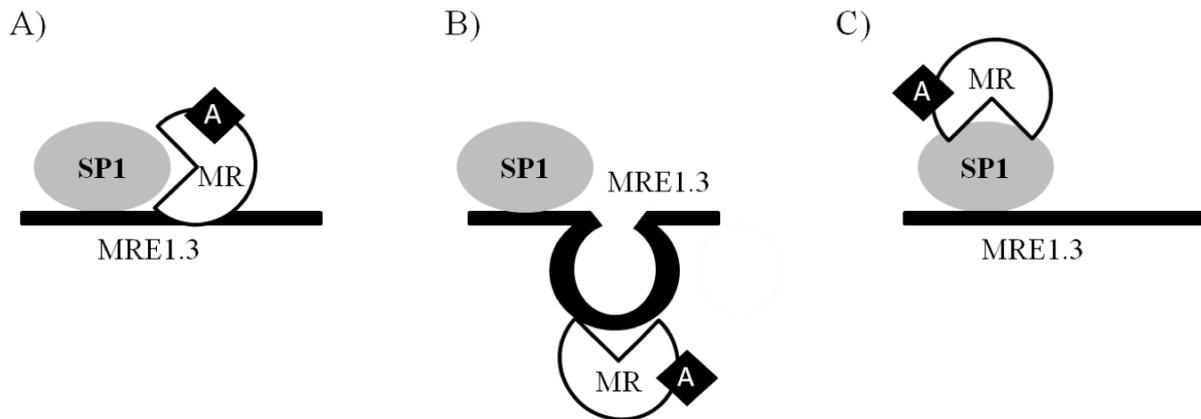


Abb. 32: Mögliche Modelle der MR-SP1-MRE1.3-Interaktion. A) MR und SP1 binden in räumlicher Nähe an MRE1.3. B) SP1 ändert durch Bindung an MRE1.3 die 3D-Struktur und ermöglicht so die Bindung des MR. C) MR bindet an SP1, welches an MRE1.3 gebunden ist.

Weiterhin unklar ist, ob SP1 und MR als Monomere oder Multimere an das Mineralokortikoid-responsive Element binden, und eventuell weitere Kofaktoren in den Mechanismus involviert sind. Hier bedarf es weiterer Aufklärung in Form von Co-Immunopräzipitationen und detaillierten Analysen des Multiproteinkomplexes mittels Massenspektrometrie oder Proteinsequenzierungen. Hierfür mangelt es momentan am Vorhandensein eines stabilen MR, was die Aufreinigung des Proteinkomplexes erschwert. Verursacht wird diese Instabilität dadurch, dass der Abbau des MR vom Vorhandensein des Liganden Aldosteron und verschiedenen posttranslationalen Modifikationen abhängig ist. So konnten Faresse et al. zeigen, dass der inaktive MR in Nierenzellen monoubiquitiniert und an Tsg101 (Tumor suppressor gene 101) gebunden vorliegt und die Bindung von Aldosteron zu einer schnellen Phosphorylierung via ERK1/2 und dadurch zur Dissoziation des MR/Tsg101-Proteinkomplexes führt. Die anschließende Entfernung des Monoubiquitin-Restes und darauffolgende Polyubiquitinierung fördern die Degradierung des MR [217,218]. Nach Yokota et al. wird der Abbau des MR in Abhängigkeit des Liganden durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg vermittelt. Experimente, in denen das Proteasom gehemmt wurde, zeigten eine Akkumulation des MR, und daraus folgend eine erhöhte Transkriptionsaktivität nach Aldosteron-Stimulation [54].

Chemische Hemmung oder *Knock-down* von SP1 verhindert die MR/Aldosteron-induzierte MRE1.3-Aktivierung

Die entscheidende Rolle und Notwendigkeit des Transkriptionsfaktors SP1 für die MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors konnte sowohl durch die Verwendung des SP1-spezifischen Inhibitors WP631 als auch durch einen spezifischen SP1-*Knock-down* mittels siRNA bewiesen werden. Die SP1-spezifische Hemmung der Transkription durch den Inhibitor WP631, einem Antibiotikum der Klasse der

Bisanthracycline, wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen [219–221]. Da die Inkubation mit WP631 die Aldosteron-abhängige MRE1.3-Aktivierung sowohl in MR-transfizierten HEK293- als auch OK-Zellen verhindert, können zellspezifische Effekte ausgeschlossen werden. In OK-Zellen läßt sich eine Dosisabhängigkeit dieser WP631-Wirkung nachweisen. Gleichzeitig konnte die Spezifität der SP1-MR-MRE1.3-Interaktion durch die Wiederholung der Experimente mit dem GRE-Reporterelement bestätigt werden, da eine Hemmung des Transkriptionsfaktors in diesem Fall keinen Einfluss auf die gesteigerte Reporterogenaktivität nach Stimulation mit Aldosteron im Vergleich zu DMSO zeigte. Trotz eines unvollständigen SP1-*Knock-downs* in den HEK293-Zellen mit einem SP1-Proteingehalt von ca. $34,5 \pm 6\%$ der Kontrollzellen, zeigte sich auch in den Reportergen-Assays mit spezifischer SP1-siRNA eine starke Reduktion der MR/Aldosteron-induzierten Aktivierung des Mineralokortikoid-responsiven Elements (MRE1.3). Diese Resultate unterstreichen die Bedeutung der Interaktion von MR und SP1 mit der MRE1.3-Sequenz des EGFR-Promotors für die Aldosteron-induzierte Expression des EGFR. Demzufolge wurde mit dem Transkriptionsfaktor SP1 ein entscheidender Faktor der durch den aktivierten MR verursachten genomischen Regulation des EGFR identifiziert, der ebenso wichtig für die pathophysiologischen Effekte der MR-EGFR-Interaktion zu sein scheint. So ist bekannt, dass die MR/Aldosteron-induzierte Steigerung der EGFR-Expression sowohl die Anzahl an EGFR-Molekülen als auch die Verfügbarkeit des Rezeptors für vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II oder Endothelin-1 erhöht [10,156,158,160]. Durch den MR vermittelte pathologische Effekte von Angiotensin II wurden bereits beschrieben und führen zu Veränderungen der Gefäße im Herzen, oxidativem Stress und letztendlich der Hypertrophie und Fibrose des Herzens [222–226].

4.1.2. Die Rolle des Transkriptionsfaktors SP3 für den Mechanismus der Aldosteron-abhängigen EGFR-Promotoraktivierung

SP1 gehört zu einer kleinen Familie von Transkriptionsfaktoren, die neben SP1 noch die Proteine SP2, SP3 und SP4 umfasst. Alle vier Vertreter dieser Familie zeigen enge strukturelle sowie funktionelle Gemeinsamkeiten. Ihre DNA-Bindedomäne ist hoch konserviert und besteht aus drei Zinkfinger-Motiven am C-Terminus und Serin/Threonin- sowie Glutamin-reichen Domänen am N-Terminus [227–231]. Es konnte gezeigt werden, dass SP1, SP3 und SP4 das klassische SP1-Bindemotiv (GC-Box: GGGGCGGGG) mit gleicher Affinität binden können [228,232] und dieses auf jeweils drei konservierten Aminosäuren innerhalb der drei Zinkfinger-Motive beruht, im speziellen: KHA im ersten, RER im zweiten und RHK im dritten Motiv [233,234]. Im Gegensatz dazu weist der Transkriptionsfaktor SP2 anstelle des Histidins innerhalb des ersten Zinkfinger-Motivs einen Leucin-Rest auf. In Abhängigkeit dieser strukturellen Veränderung wurde anhand der 5'-flankierenden Region des T-Zell-Rezeptor-Gens nachgewiesen, dass SP2 nicht an die GC-

Box bindet, jedoch an die verwandte GT/CACCC-Box (GGTGTGGGG) [235]. Ein ubiquitäres Vorkommen von SP1 und SP3 in allen Zellarten und Geweben konnte durch Saffer et al. sowie Hagen et al. gezeigt werden [232,236], wohingegen SP4 gewebsspezifisch und hierbei hauptsächlich in neuronalen Zellen des Gehirns wirksam ist [232,237].

SP3 bindet spezifisch an MRE1.3, zeigt jedoch keinen Einfluss auf die MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors

Auf Grund der gemeinsamen Erkennungssequenz von SP1 und SP3 sowie dem ubiquitären Vorkommen beider Transkriptionsfaktoren, wurde der Einfluss von SP3 auf die MR/Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung untersucht. *Electromobility Shift Assays* mit einer biotinylierten Sonde der SP1/SP3-Konsensussequenz konnten eine hoch affine Bindung der Sonde an rekombinantes humanes SP3-Protein zeigen, wohingegen nur eine sehr schwache Bindung des MRE1.3-Promotorelements an den Transkriptionsfaktor detektierbar war. Die Bindungsaffinität von SP1 für das Mineralokortikoid-responsive Element scheint demnach stärker zu sein als die des SP3. Mittels *SP3-Knock-down* sollte der Einfluss des Transkriptionsfaktors näher charakterisiert werden. Ein spezifischer *Knock-down* des Proteins erfolgte 96 h nach Inkubation mit SP3-spezifischer siRNA auf einen Wert von ca. $16,4 \pm 5\%$ der SP3-Gesamtproteinmenge aus untransfizierten oder mit scrambled siRNA behandelten Zellen. Reporteragen-Assays in MR-transienten und mit Aldosteron-stimulierten Zellen zeigten keinen Einfluss eines *SP3-Knock-downs* auf die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung. So zeigen HEK293-Zellen, die sowohl ohne siRNA oder mit scrambled siRNA als auch Zellen, die mit SP3-spezifischer siRNA inkubiert wurden, nach Inkubation mit dem Liganden eine Steigerung der MRE1.3-Aktivität im Vergleich zur Behandlung mit DMSO. Obwohl der *Knock-down* des SP3-Proteins unvollständig war, ist nicht damit zu rechnen, dass ein vollständiger *Knock-out* des Transkriptionsfaktors zu einer signifikanten Reduktion der MR-abhängigen EGFR-Expression führt. Zum einen spricht die schwächere Bindung an MRE1.3 im Vergleich zu SP1 gegen einen direkten Einfluss, zum anderen genügte in den Experimenten mit SP1-spezifischer siRNA eine Reduktion des SP1-Proteins auf ein Niveau von ca. 35 % der Kontrollzellen, um die Aldosteron-induzierte Reporteragenaktivierung komplett zu verhindern.

In der Vergangenheit konnte am Beispiel des Retinoblastom- sowie des Uteroglobulin-Promotors gezeigt werden, dass SP3 sowohl als Aktivator [238,239] als auch als Repressor der SP1-vermittelten Transkription fungieren kann [228]. Hierbei scheint die Struktur und Anordnung der Erkennungssequenzen dafür verantwortlich zu sein, ob SP3 transkriptionell inaktiv bleibt, und ob SP3 die SP1-vermittelte Expression reprimiert oder als starker Aktivator wirkt. Es wird beschrieben, dass Promotoren, die ein einzelnes Bindemotiv enthalten, aktiviert werden, wohingegen Promotoren mit multiplen Erkennungssequenzen oft inaktiviert

bleiben oder nur sehr schwach auf SP3 reagieren [239,240]. Wie beschrieben, konnten durch Kageyama et al. und Vallian et al. auf dem gesamten EGFR-Promotor mindestens zwei SP1-Erkennungssequenzen identifiziert werden [205,206], sodass diese Anordnung dafür verantwortlich sein könnte, dass SP3 für den Mechanismus der MR-abhängigen Induktion des MRE1.3-Promotorelements keine Rolle spielt.

4.2. Pathophysiologische Relevanz des Transkriptionsfaktors SP1 für MR-vermittelte Signalwege

Um die Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 für die MR/Aldosteron-vermittelte genomische Regulation des EGFR zu verdeutlichen, wurde die SP1-abhängige Expression des Rezeptors in zwei verschiedenen Arten glatter Gefäßmuskelzellen, sowohl in Primärkultur als auch in einer Zelllinie, analysiert. Die Auswahl dieser Zelltypen erfolgte aufgrund dessen, dass diese für die pathophysiologischen Effekte des MR relevant sind. Zellen der Aorta von Mensch (HAoSMC) und Ratte (A7r5) wurden dementsprechend hinsichtlich ihrer EGFR-Expression nach chemischer SP1-Hemmung durch den Inhibitor WP631 nach Stimulation mit Aldosteron im Vergleich zu Kontrollzellen mit DMSO charakterisiert. Eine Stimulation der Zellen mit 10 nM Aldosteron bewirkt im Vergleich zur Behandlung mit DMSO unabhängig vom untersuchten Organismus eine signifikante Steigerung der Expression des EGFR. Diese Beobachtung stimmt mit den Daten vorangegangener Arbeiten und Veröffentlichungen überein, in denen diese MR/Aldosteron-abhängige Überexpression des EGFR in Herz, Aorta und Nieren bereits ausführlich beschrieben wurde [10,156,158–160]. Eine spezifische Hemmung des Transkriptionsfaktors SP1 durch den Inhibitor WP631 verhindert die Aldosteron-induzierte Steigerung der EGFR-Expression in beiden glatten Gefäßmuskelzellarten. In den glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen, nicht jedoch in den A7r5-Zellen, bewirkte die SP1-Hemmung weiterhin auch eine Reduktion der basalen EGFR-Expression. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die wichtige Rolle des identifizierten Kofaktors der MR-vermittelten Regulation und helfen, den Mechanismus der MR-EGFR-Interaktion genauer zu charakterisieren. Lagrange et al. konnten die Relevanz des Transkriptionsfaktors SP1 für den Mechanismus der MR/Aldosteron-induzierten Aktivierung für die Expression des endothelialen Protein C-Rezeptor (EPCR) bestätigen. Mutationen der SP1-Bindestelle innerhalb des EPCR-Promotors führen zu einer Hemmung der Aldosteron-induzierten Expression des Rezeptors [241], sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um einen generellen Mechanismus MR/Aldosteron-induzierter Signalkaskaden handeln könnte.

4.3. Lokalisierung von EGFP-SP1 und RFP-MR in HEK293-Zellen

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde EGFP-markiertes SP1 ubiquitär, also sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, nachgewiesen, wohingegen RFP-markierter MR in inaktiver Form auf das Zytoplasma begrenzt lokalisiert war. Stimulation mit 10 nM Aldosteron führt innerhalb kürzester Zeit ($t_{1/2} = 6$ min) zur Translokation des RFP-MR in den Zellkern, wohingegen keine Änderungen der EGFP-SP1-Verteilung in der Zelle zu beobachten war. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass SP1 als Transkriptionsfaktor, der an der Regulation vieler verschiedener Prozesse beteiligt ist, hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist. So konnte bereits 1999 durch Kuwahara et al. eine nukleäre Lokalisierung von EGFP-markiertem SP1 in HeLa-Zellen nachgewiesen werden [242]. Bekannt ist außerdem, dass die Lokalisierung von der Stabilität des SP1 sowie der Interaktion mit anderen Kofaktoren abhängig ist [243–246]. Beschrieben wird, dass eine SUMOylierung den Abbau von SP1 fördert und SUMO-1-gebundenes SP1 in das Zytosol transloziert, wo es mit rpt6 (Proteasom 19S ATPase-Untereinheit) interagiert und proteolysiert wird [243]. Weiterhin konnte durch Wang et al. gezeigt werden, dass HSP90 während der Mitose für die SP1-Stabilität entscheidend ist. So interagieren HSP90 und SP1 in der Prophase, wodurch SP1 vor der Ubiquitin-abhängigen Degradierung geschützt wird [244]. Einen entscheidenden Einfluss der Zinkfinger-Motive für die Translokation von SP1 in den Zellkern beschreiben Ito et al.. Die Studien zeigen, dass die Zinkfinger-Motive von GST-fusioniertem SP1 an endogenes Importin α binden und infolgedessen SP1 in den Zellkern transloziert. Es wird postuliert, dass die Zinkfinger-Motive als Kernlokalisierungssequenz (NLS) fungieren, wenn damit auch keine klassische NLS vorliegt [245]. Bei der Lokalisierung des EGFP-markierten SP1-Proteins sowohl im Zellkern als auch Zytoplasma muss beachtet werden, dass der Transkriptionsfaktor ohnehin in den HEK293-Zellen exprimiert wird und im Rahmen der Untersuchungen stark überexprimiert vorliegt. Eine gleichmäßige Verteilung im Zytosol und Zellkern könnte darauf beruhen, dass die Überproduktion des Transkriptionsfaktors SP1 dazu führt, dass ein sofortiger Abbau im Zytosol mittels Ubiquitin-abhängigem Signalweg oder SUMO-1-induzierter Proteolyse erfolgt. Auch die Lokalisierung des inaktiven RFP-markierten MR im Zytoplasma sowie die durch Aldosteron-induzierte Translokation in den Nukleus stimmen mit der Literatur überein. In Abwesenheit des Liganden liegt der MR hauptsächlich im Zytosol vor [247,248]. Durch Tóth, Pearce und Tóth konnte in CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) anhand von GFP-MR im Jahr 1998 gezeigt werden, dass die Stimulation des Rezeptors mit Aldosteron bereits nach 30 sec zu einer Translokation der Moleküle in der Zelle führt, die nach 30 min vollständig abgeschlossen war [249]. In Abhängigkeit des Zelltyps beträgt die Halbwertszeit der MR-Translokation zwischen 6 und 12 Minuten [250]. In seiner inaktivierten Form liegt der MR an verschiedene Chaperone, wie z.B. HSP90, gebunden vor. Während in früheren Studien davon ausgegangen wurde, dass

MR und HSP90 nach Bindung des Liganden Aldosteron dissoziieren [34,251,252], konnte durch Grossmann et al. gezeigt werden, dass der MR während der Aldosteron-induzierten Translokation sowohl im Zytosol als auch im Zellkern an HSP90 gebunden vorliegt [250]. Es lässt sich zusammenfassen, dass eine MR-Aktivierung zumindest bei Überexpression von SP1 keine Auswirkungen auf die Lokalisation des Transkriptionsfaktors zeigt.

4.4. Identifikation weiterer Mineralokortikoid-responsiver Elemente

Mit MRE1.3 konnte erstmals ein für den MR spezifisches responsives Element identifiziert werden, welches kein klassisches GRE-Element enthält und daher nicht auch vom Glukokortikoidrezeptor erkannt wird. Um zu untersuchen, wie relevant die anhand des EGFR-Promotors identifizierte MR-SP1-Interaktion für die Regulation anderer Gene ist, wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bioinformatik ein genomweiter Sequenzvergleich zwischen allen humanen Promotoren sowie der MRE1.3-Sequenz bzw. verschiedenen Infixen des Elements durchgeführt. Für einen 16 bp langen Infix, der das SP1-Bindemotiv enthält, konnten diverse Promotoren putativer Zielgene mit einem Score von -0,81 (der Maximalwert -1 entspricht einer 100 %-igen Sequenzidentität) identifiziert werden. Die Validierung drei der 11 ausgewählten putativen Zielgene erfolgte mittels qPCR. Kandidatengene, die durch Zugabe des Liganden Aldosteron reguliert wurden, sind der Heparin-bindende Wachstumsfaktor HDGF (Hepatoma-Derived Growth Factor), die regulatorische Untereinheit 7 der Protein Phosphatase 1 (PPP1R7) und das ranGTPase-aktivierende Protein 1 (RanGAP1). Während für HDGF und PPP1R7 nach Inkubation mit Aldosteron im Vergleich zu DMSO eine Reduktion der mRNA-Menge nachgewiesen wurde, zeigte RanGAP1 im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression. Bei HDGF handelt es sich um den Prototyp einer Proteinfamilie, die in verschiedenen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen, mitogen wirken [253]. Außerdem zeigen Studien, dass HDGF die Expression von Matrix-Metalloproteasen verändert und kardiovaskuläres Wachstum sowie die kardiovaskuläre Differenzierung reguliert [254,255]. Das ranGTPase-aktivierende Protein 1 hingegen beeinflusst den Transport von Proteinen zwischen Nukleus und Zytoplasma und ist außerdem in die Bildung der Mikrotubuli während der Mitose involviert [256,257]. Interessanterweise konnte eine gesteigerte Expression von RanGAP1 in Patienten mit kardialer Ischämie gezeigt werden [258]. Studien zur Funktion der regulatorischen Untereinheit 7 der Protein Phosphatase 1 zeigen einen Einfluss der PPP1R7 auf die Regulation des Zellzyklus [259]. Weiterhin ist bekannt, dass eine verminderte Expression der PPP1R7 mit der Progression von Tumoren assoziiert ist [260].

Auf Grund der beschriebenen Funktionen der identifizierten Kandidatengene im kardiovaskulären System sowie bei der Mitose und Differenzierung von Zellen, erscheint die

Hypothese, dass diese an den pathophysiologischen Effekten des MR im Herzen beteiligt sein können, plausibel. Eine weitere Validierung dieser Hypothese sowie die genaue Charakterisierung des Interaktions- und Wirkungsmechanismus stehen jedoch noch aus und müssen im Folgenden abgeschlossen werden. Dennoch scheint der neue MR-spezifische molekulare Mechanismus, der anhand des pathophysiologisch relevanten EGFR entdeckt werden konnte, auch auf andere Zielgene und deren Promotoren übertragbar zu sein. In Ergänzung zu diesem gerichteten Ansatz der MRE-Suche soll in einem Folgeprojekt die Suche nach weiteren MR-regulierten Genen in einem ungerichteten Ansatz mittels ChIP-Seq- und RNA-Seq-Experimenten fortgesetzt werden. Anschließend sollen die identifizierten Promotorelemente mit den Expressionsdaten verglichen werden, um weitere MR/Aldosteron-induzierte Zielgene identifizieren zu können, und so weiteren Aufschluss über die pathophysiologischen Wirkungsmechanismen des MR zu erhalten.

4.5. Korrelation zweier *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) des EGFR-Promotors mit dem Auftreten renokardiovaskulärer Erkrankungen

4.5.1. Bindung an SP1 sowie MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung der MRE-SNPs

Innerhalb des identifizierten MRE1.3-Promotorelements sind zwei SNPs, rs712830 (-191 C/A; MRE1.3-SNP1) sowie rs712829 (-216 G/T; MRE1.3-SNP2) bekannt, die auf Grund der nachgewiesenen Relevanz von MRE1.3 und SP1 für die MR/Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung hinsichtlich ihrer MR-induzierten Aktivierung charakterisiert wurden. Hierbei unterscheiden sich die Allelfrequenzen deutlich. So beträgt die Allelfrequenz für das Vorkommen eines Cytosins an Stelle -191 des Promotors 0.802 im Vergleich zu Adenin mit 0.198. Für den Polymorphismus rs712829 an Stelle -216 betragen die Allelfrequenzen für Guanin 0.619 und für Thymin 0.381. Somit handelt es sich bei MRE1.3-SNP2 (-216 G/G; -191 C/C) um das Promotorelement, welches am häufigsten in einer Population auftritt. Mit der Identifikation des Mineralokortikoid-responsiven Elements MRE1.3 sowie dem für die Aldosteron-induzierte Aktivierung essentiellen Transkriptionsfaktor SP1 konnte ein entscheidender Initiator der EGFR-vermittelten pathophysiologischen MR-Effekte aufgeklärt werden. Da sich der SNP rs712829 innerhalb des identifizierten SP1-Bindemotivs befindet, sollten Auswirkungen auf die Aldosteron-induzierte Aktivierung der EGFR-Überexpression analysiert werden.

SP1 bindet *in vitro* an die drei MRE1.3-SNPs, wohingegen SP1 aus Zellkernextrakten ausschließlich mit MRE1.3, nicht jedoch MRE1.3-SNP1 oder -SNP2 interagiert

Mittels EMSAs konnte gezeigt werden, dass sowohl MRE1.3 (-216 T/T; -191 C/C) als auch MRE1.3-SNP1 (-216 G/G; -191 A/A) und MRE1.3-SNP2 (-216 G/G; -191 C/C) *in vitro* an rekombinantes humanes SP1 binden können. Die Wiederholung der Analysen mit SP1 aus Zellkernextrakten MR-transfizierter und Aldosteron-stimulierter Zellen hingegen zeigte, dass

nur MRE1.3 spezifisch an SP1 bindet, wohingegen MRE1.3-SNP1 und -SNP2 keine spezifische Bande aufweisen. Eine Bindung der SNP1- und SNP2-Promotorsequenzen an einen Proteinkomplex mit oder ohne SP1 und weiteren Faktoren, wie zum Beispiel dem MR oder verschiedenen Homo- oder Heterodimeren aus den verwandten Transkriptionsfaktoren SP2 und SP3 wäre vorstellbar. So ist bekannt, dass SP1 und SP3 *in vivo* um das gemeinsame Bindemotiv konkurrieren und das Verhältnis beider Transkriptionsfaktoren zueinander von Zelltyp zu Zelltyp variiert [231,261]. Die Ergebnisse der Analysen zeigen hierbei starke Gemeinsamkeiten zu den Experimenten mit den im SP1-Bindemotiv mittels Punktmutationen veränderten Promotorelementen MRE1.3mut1 und -mut2. Da die beiden Varianten MRE1.3-SNP1 und -SNP2 ein Guanin anstelle des Thymins in MRE1.3 aufweisen und sich dieser Polymorphismus innerhalb der SP1-Bindesequenz befindet, lässt sich die Relevanz des validierten SP1-Bindemotivs noch einmal bestätigen. Die *in silico* vorhergesagten SP1-Bindemotive im 3'-Bereich konnten hingegen weder für die MRE1.3-Sequenz noch für die SNP-Varianten mittels EMSA bestätigt werden. Für die SP1-Bindung ist nicht entscheidend, ob sich an Stelle -191 ein Adenin oder Cytosin befindet.

MRE1.3 zeigt die stärkste MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung bei niedriger basaler Promotoraktivität

Weiterhin wurde anhand von Reporteragen-Assays gezeigt, dass sich die Unterschiede in der Bindung an SP1 unabhängig vom Organismus sowohl auf die basale als auch die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung der verschiedenen SNPs auswirken. So zeigt MRE1.3 (-216 T/T; -191 C/C) die geringste basale Promotoraktivität, lässt sich jedoch durch den Liganden Aldosteron am stärksten induzieren. Im Gegensatz dazu, zeigen MRE1.3-SNP1 (-216 G/G; -191 A/A) und MRE1.3-SNP2 (-216 G/G; -191 C/C) eine deutliche höhere basale Aktivität im Vergleich zu MRE1.3 (SNP1 > SNP2 > MRE1.3), lassen sich jedoch kaum durch Aldosteron induzieren. Hierbei zeigt MRE1.3-SNP1 nach Stimulation mit Aldosteron in HEK293-Zellen dennoch eine signifikante Induktion, wohingegen MRE1.3-SNP2 keine signifikante MR/Aldosteron-abhängige Aktivierung zeigt (MRE1.3 > SNP1 > SNP2). Zellspezifische Unterschiede sowohl in der basalen als auch MR/Aldosteron-induzierten Promotoraktivierung im Vergleich von OK (Opossum)- und HEK293 (human)-Zellen erklären sich durch Schwankungen der Grundaktivität der Zellen, die die Stimulierbarkeit bedingen, Organismus-spezifische Faktoren oder auch durch die Verwendung unterschiedlicher Zellpassagen.

Eine MR-abhängige Steigerung der EGFR-Expression konnte in verschiedenen Organen, wie z.B. Herz, Aorta und Nieren, durch diverse Arbeitsgruppen beschrieben werden [10,156,158–160]. Die SP1-abhängige Aktivierung des EGFR-Promotors in Abhängigkeit des Polymorphismus an Stelle -216 wurde bereits in Krebszelllinien durch Liu et al.

nachgewiesen. In deren Studien bewirkte ein Austausch des Guanins zu Thymin eine Aktivitätssteigerung des Promotors um 30%. Weiterhin wurde beschrieben, dass das T-Allel im Gegensatz zum G-Allel eine wesentlich stärkere Bindungsaffinität an SP1 aufweist [262]. Im Rahmen dieser Promotion konnte die höhere Bindungsaffinität des T-Allels an SP1 aus nukleären Extrakten durch EMSAs validiert werden, wohingegen die stärkere Bindung des T-Allels an rekombinantes SP1 nicht bestätigt wurde, da sowohl für MRE1.3 (-216 T/T) als auch MRE1.3-SNP1 und -SNP2 (-216 G/G) eine Bindung an rhSP1 nachgewiesen werden konnte.

Chemische Hemmung von SP1 reduziert die MR/Aldosteron-abhängige, jedoch nicht die basale Aktivierung von MRE1.3

Die Ergebnisse bestätigen eine Abhängigkeit der EGFR-Promotoraktivierung vom Transkriptionsfaktor SP1 und zeigen erstmalig den Zusammenhang zwischen der MR/Aldosteron- sowie SP1-abhängigen Expression des EGFR. In Folgeexperimenten mit dem SP1-Inhibitor WP631 konnte gezeigt werden, dass sowohl die basale als auch die Aldosteron-induzierte Promotoraktivität nach SP1-Hemmung reduziert wird. Eine signifikante Hemmung der MR/Aldosteron-abhängigen Steigerung der Reporter-gen-Aktivität durch den Inhibitor war für alle MRE1.3-Varianten nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war die basale MRE1.3-Aktivität nicht signifikant verändert, wohingegen die Basalaktivität der MRE1.3-SNP1 und -SNP2-Promotorelemente signifikant um 50% reduziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass SP1 nicht nur Einfluss auf die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivität hat, sondern auch an der Regulation der basalen Aktivität beteiligt ist. Auf Grund der unterschiedlichen Bindung der Promotorelemente an SP1 aus Zellkernextrakten MR-transfizierter und Aldosteron-stimulierter HEK293-Zellen und der unterschiedlichen Effekte auf die Grundaktivität der MRE1.3-Varianten lässt sich vermuten, dass SP1 im Komplex mit anderen Proteinen in Form von Homo- oder Heterodimeren die basale Promotoraktivität des EGFR abhängig vom SNP reguliert. Die Stimulation mit Aldosteron könnte dann zu einer Änderung des Proteinkomplexes führen. Hierbei bindet SP1 im Zellkernextrakt mit einer hohen Affinität an MRE1.3 (-216 T/T; -191 C/C), wohingegen die Bindung an MRE1.3-SNP1 (-216 G/G; -191 A/A) und -SNP2 (-216 G/G; -191 C/C) erschwert und somit das Ausmaß der Aldosteron-induzierten SP1-abhängigen Aktivierung verringert wird. Unspezifische Effekte des Inhibitors, die ebenfalls zur Beeinflussung der basalen Promotoraktivität führen könnten, sollten durch ein Folgeexperiment mit spezifischer siRNA ausgeschlossen werden.

4.5.2. Korrelation der SNPs mit kardiovaskulären Erkrankungen

Eine Korrelation der untersuchten EGFR-Promotorpolymorphismen konnte bereits im Zusammenhang mit dem Auftreten verschiedener Krebserkrankungen demonstriert werden. So wurde beschrieben, dass das -216 T-Allel als Risikofaktor und prognostischer Marker für die Entstehung von Glioblastomen (Hirntumoren) ist und Patienten häufiger ein Thymin an Stelle -216 des EGFR-Promotors aufweisen als Probanden der Kontrollgruppe ohne Glioblastom ($224/376 = 59.6\%$ vs $165/352 = 46.8\%$; $p = 0.0006$) [263]. Beschrieben wird außerdem, dass der -216 G/T-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko der Metastasierung von Adenokarzinomen der Lunge assoziiert ist. So war der Anteil an Patienten mit den Genotypen -216 G/T und -216 T/T signifikant höher in der Gruppe mit Metastasierungen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Metastasenbildung. Hierbei wird vermutet, dass die Metastasenbildung durch die SP1-abhängige EGFR-Überexpression bedingt wird [264]. Ein Einfluss des Polymorphismus -216 G/T auf Nebenwirkungen bei der Behandlung von Tumorpatienten mit Gefitinib konnte durch McKibbin et al gezeigt werden [265]. Gefitinib, ein Medikament aus der Wirkstoffklasse der Tyrosinkinase-Inhibitoren, hemmt hauptsächlich Tyrosinkinasen der EGFR-Familie und wird in der Krebstherapie als Hemmer des Tumorwachstums eingesetzt [266–268]. Die Behandlung mit Gefitinib führt in Patienten mit dem Haplotyp (-216T) zu einem erhöhten Risiko, Begleiterscheinungen in Form von Hautausschlag und Diarrhoe aufzuweisen [265,269].

Da der Einfluss der MRE1.3-SNPs an der Entstehung von Krebserkrankungen auf die SP1-abhängige Überexpression des EGFR zurückgeführt werden kann, und die durch MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors als Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen bekannt ist, erscheint die Hypothese einer Korrelation der MRE1.3-Varianten mit dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen vorstellbar. Hierfür wurden in zwei verschiedenen Kohorten (CARLA und SHIP) die Häufigkeiten der SNP-Genotypen der Probanden mit der Häufigkeit bestimmter Marker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen korreliert.

Der MRE1.3-Genotyp korreliert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit, an Vorhofflimmern zu erkranken

Von allen ausgewählten medizinischen Parametern konnte in beiden Studien eine Korrelation des Auftretens von Vorhofflimmern mit dem MRE1.3-Promotorelement nachgewiesen werden (nicht signifikant veränderte Parameter in Anhang B1.2 dargestellt). So ist die Wahrscheinlichkeit, an Vorhofflimmern zu erkranken, für eine Person mit der MRE1.3-Variante (-216 T) um das ungefähr 2,2-fache (CARLA) bzw. 2-fache (SHIP) erhöht im Vergleich zu Probanden mit MRE1.3-SNP2 (-216 G). Im Gegensatz dazu liegt die Wahrscheinlichkeit dafür bei Probanden mit MRE1.3-SNP1 (-191 A) im Vergleich zu -SNP2 (-191C) bei ca. 0,8 (CARLA) bzw. 0,6 (SHIP). Hierbei ist zu beachten, dass bedingt durch die

geringe Anzahl an relevanten Probanden aus der CARLA-Studie große Abstände zwischen Minimum und Maximum des Konfidenzintervalls liegen. Diese sind auf Grund der höheren Teilnehmerzahl in der SHIP-Studie wesentlich geringer, sodass die *Odds Ratio* hier aussagekräftiger ist. Dennoch zeigte sich in beiden Studien eine signifikante Korrelation des Auftretens von Vorhofflimmern mit dem MRE1.3-Genotyp.

Vorhofflimmern ist eine vorübergehende (transiente) oder dauerhafte (permanente) Herzrhythmusstörung, die durch eine veränderte Erregungsausbreitung in den Herzvorhöfen bedingt wird. Ein normaler Sinusrhythmus ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vorhöfe und Herzkammern unmittelbar nacheinander etwa 70-mal pro Minute stimuliert werden. Ungerichtete elektrische Impulse über die Vorhöfe führen hingegen zu kreisenden Erregungen und schnellen, ungeordneten Bewegungen der Vorhof-Wände sowie einer unregelmäßigen Überleitung auf die Herzkammern, was bei einer Erregung mit einer Frequenz von 350-600 pro Minute als Vorhofflimmern bezeichnet wird. Abbildung 33/A stellt die Phasen der Erregungsleitung bei normalem Sinusrhythmus dar, wohingegen Abbildung 33/B die Elektrokardiogramme von Sinusrhythmus und Vorhofflimmern gegenüberstellt.

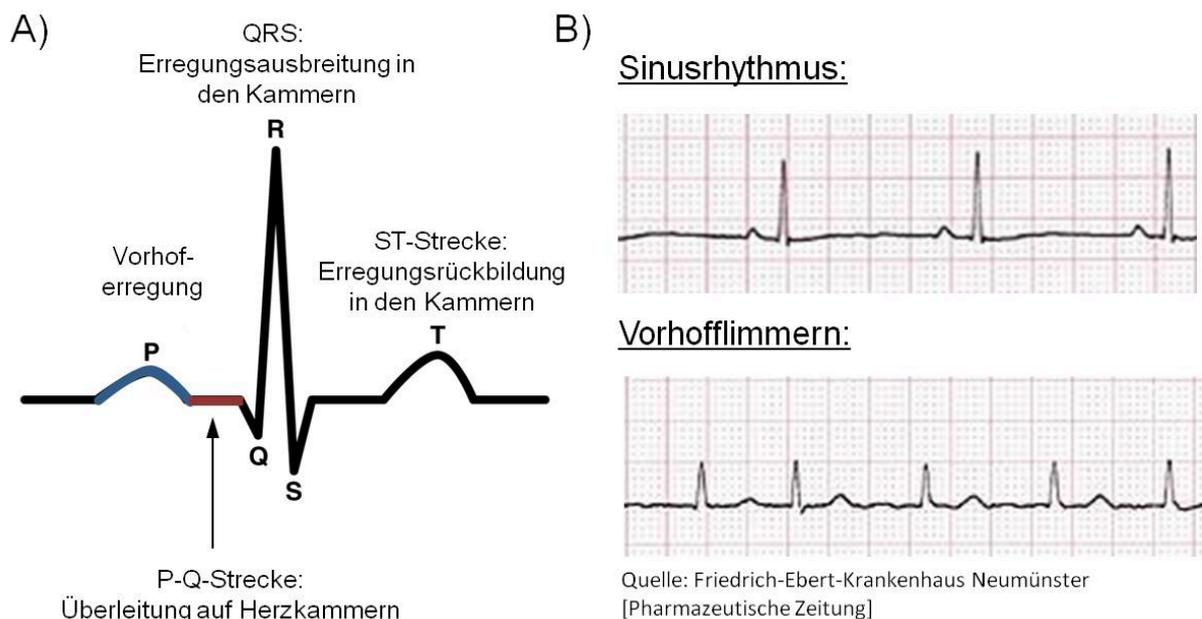


Abb. 33: Elektrokardiogramm bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern. A) Schema der einzelnen Phasen der Erregungsleitung im Herzen. B) Gegenüberstellung von Sinusrhythmus und Vorhofflimmern.

Der charakteristische Verlauf eines Aktionspotenzials in Kardiomyozyten und in Schrittmacherzellen des Sinusknotens sowie die entsprechenden Leitfähigkeiten der verschiedenen Ionenkanäle kann dem Anhang C1 entnommen werden. Vorhofflimmern kann spontan durch einen akuten Auslöser, wie z.B. spontane Freisetzung von Calcium oder einen Stromschlag, entstehen, tritt jedoch häufiger bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bzw. mit kardiovaskulären Schäden auf Grund von Bluthochdruck, Diabetes oder koronaren Gefäßerkrankungen auf [270–273]. In verschiedenen Arbeiten konnte demonstriert werden, dass die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern durch die Veränderung der strukturellen, mechanischen und elektrischen Eigenschaften des Vorhof-Gewebes begünstigt wird [274–276]. Diese charakteristischen Veränderungen werden als Substrate des Vorhofflimmerns bezeichnet und sind Grundlage für Initiation und Fortbestand der Arrhythmie [274,276]. Bekannte Substrate, die als Prädisposition für ein Flimmern der Atrien beschrieben werden, sind Vergrößerungen der Vorhöfe sowie deren Fibrose [277–279]. Hierbei wurde außerdem beschrieben, dass das Vorhofflimmern ebenfalls strukturelle Veränderungen und die Fibrose des linken Atriums bewirkt [277,280]. Sanders et al. konnten nachweisen, dass Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz sowohl Überleitungsdefekte als auch eine Vergrößerung des Atriums zeigen [281]. Solche Überleitungsstörungen sind wiederum verbunden mit einem strukturellen Umbau des Gewebes in Form von Fibrose und Hypertrophie [280], sodass die Entstehung von Vorhofflimmern oft dazu führt, dass die Entwicklung von weiterem Flimmern bzw. dessen Fortbestand begünstigt wird [282].

Das für pathophysiologische Veränderungen des renokardiovaskulären Apparates bekannte Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz aktiviert [283], wobei das Ausmaß der Aktivierung mit der Schwere der Herzinsuffizienz steigt [271]. So ist das Auftreten von Herzinsuffizienz mit einer erhöhten Aldosteron-Produktion assoziiert [284,285]. Sowohl Angiotensin II als auch Aldosteron führen zur Fibrose des Atriums und können so zur Entwicklung von Vorhofflimmern beitragen [286–288]. Weber et al. konnten nachweisen, dass Aldosteron im Vergleich zu Angiotensin II eine stärkere fibrotische Wirkung zeigt und die Aktivierung des MR mit Aldosteron oder Cortisol dramatische Effekte in Patienten mit Herzinsuffizienz bewirkt [289]. So ist Hyperaldosteronismus mit einer 12-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit für Vorhofflimmern assoziiert [86,290]. In Bluthochdruck-Modellen in Ratten bewirkt die chronische Aldosteron-Gabe sowohl in den Atrien als auch Ventrikeln Gewebsfibrosen [291,292]. Aldosteron-behandelte Ratten zeigen weiterhin einen erhöhten Anteil an interstitiellem Kollagen, eine Reduzierung der Metalloprotease 13 (Collagenase 3), eine Hypertrophie der Myozyten des Atriums und der Ventrikel sowie eine verminderte Anzahl der Myozyten/mm² Gewebequerschnitt, wohingegen die Anzahl der Fibroblasten/mm² Gewebequerschnitt in den

Vorhöfen steigt [280]. Die Aldosteroneffekte, die zur Entstehung von Vorhofflimmern führen können, werden hauptsächlich durch den MR vermittelt. De-An et al. zeigen, dass der Proteingehalt an MR und 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 in Vorhof-Myozyten von Patienten mit Vorhofflimmern signifikant erhöht ist [278,293]. Die Behandlung von Patienten mit RAAS-Antagonisten, wie Inhibitoren des *Angiotensin Converting Enzyme*, Angiotensin-Rezeptor-Blockern oder MR-Antagonisten reduzieren die Fibrose des Atriums und dadurch das Auftreten von Vorhofflimmern in Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant [287,290,294–298]. In verschiedenen Arbeiten konnte weiterhin gezeigt werden, dass die MR-Antagonisten Spironolakton und Eplerenon die Fibrose in den Vorhöfen verringern und dadurch sowohl spontanes Vorhofflimmern unterdrücken [271,290] als auch die Aufrechterhaltung des Flimmerns verhindern [296,298]. Die in der Literatur beschriebenen Aldosteron-abhängigen pathophysiologischen MR-Effekte bekräftigen die Hypothese der Korrelation der EGFR-Promotorpolymorphismen mit der Wahrscheinlichkeit, an Vorhofflimmern zu erkranken. So zeigen Reporteragen-Assays mit dem MRE1.3-Promotorelement (-216T/-; -191C/-) eine signifikante MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung und daraus folgend eine Überexpression des EGFR. Dies könnte in Trägern des MRE1.3-Promotorelements ursächlich für die erhöhte Prävalenz für Vorhofflimmern im Vergleich zu Trägern des MRE1.3-SNP1- (-216G/-; -191A/-) und MRE1.3-SNP2-Promotorelements (-216G/-; -191C/-) sein. Im Gegensatz dazu ist zwar die basale Promotoraktivität von MRE1.3-SNP1 und -SNP2 größer als die des MRE1.3, die Aldosteron-abhängige Aktivierung jedoch wesentlich geringer, was mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit, an Vorhofflimmern zu erkranken, verbunden sein könnte.

Ein Zusammenhang zwischen EGFR und dem Auftreten fibrotischer Veränderungen konnte in Fibroblasten der Niere durch Chen et al. gezeigt werden. Behandlung mit EGFR-Blockern bewirkt hier die Hemmung der Angiotensin II-induzierten TGF- β -vermittelten Fibrose [185]. Bei TGF- β handelt es sich um einen wichtigen Mediator von Angiotensin II-Effekten, der die Aktivität von Fibroblasten stimuliert und gleichzeitig die Produktion von Angiotensin II und weiteren profibrotischen Faktoren in einer positiven Feedback-Schleife verstärkt [299]. Eine erhöhte Expression des EGFR erhöht somit die Möglichkeit des Angiotensin II den EGFR zu transaktivieren und verstärkt dadurch die pathophysiologischen Wirkmechanismen, die ein Vorhofflimmern begünstigen können.

4.5.3. Expressionsveränderungen von Ionenkanälen, die zum Vorhofflimmern beitragen können

Tab. 16: Zusammenfassung der validierten Ionenkanäle

Ionenkanal-Typ	Name	Expression nach Aldosterongabe	EGFR-Abhängigkeit der Aldosteron-induzierten Expressionsänderung
Amilorid-sensitiver Natriumkanal	Accn 1	erhöht	✓
L-Typ-Calciumkanal	Cacna1c	erhöht	✓
T-Typ-Calciumkanal	Cacna1g	erhöht	✓
	Cacna1h	erhöht	✓
	Cacna1i	erhöht	keine
Calcium-permeabler Kationenkanal	Trpv2	erhöht	✓
	Trpv4	erhöht	keine
Calcium-aktivierter Kaliumkanal	Kcnn2	erhöht	keine
Chloridkanal	Clnc3	erhöht	keine
	Clnc7	erhöht	keine
Calcium-permeabler Kationenkanal	Trpm7	erhöht	keine

Entscheidend für die Entstehung von Vorhofflimmern ist neben der Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems hinsichtlich struktureller Veränderungen, der Einfluss auf das elektrische Remodeling der Atrien. So können Veränderungen der Ionenkanäle ebenfalls zur Entstehung von Vorhofflimmern beitragen. Oftmals stehen der strukturelle und elektrische Umbau in den Vorhöfen in direktem Zusammenhang. So konnte gezeigt werden, dass interstitielle Fibrosen zu Störungen der kardialen elektrophysiologischen Eigenschaften und daraus resultierend Vorhofflimmern führen können [277,278]. Zusätzlich bewirkt die Behandlung mit MR-Antagonisten eine Verringerung des strukturellen Remodelings in Ratten, was gleichzeitig zu einer Verbesserung des elektrischen Remodelings durch Reduktion der Fibrose führt [287,288,290].

Ein direkter Einfluss von Aldosteron auf das elektrische Remodeling konnte in der Vergangenheit ebenfalls beschrieben werden. So zeigten Ratten, die mit Aldosteron behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Aldosteron eine verlängerte P-Wellen-Dauer sowie eine längere Aktivierung des rechten Atriums. Dies führt insgesamt zu einer Verlängerung der Fortleitungsdauer, sowie einer langsameren und heterogeneren Übertragung der Depolarisierungswelle im Vergleich zum normalen Sinusrhythmus [280]. Studien von Kleber et al. zeigen, dass Hyperaldosteronismus zur Verstärkung der kreisenden Erregungen in den Vorhöfen führt und so zur Stabilisierung von Arrhythmien beiträgt [300].

4.5.3.1. Calciumkanäle, die EGFR-abhängig durch MR/Aldosteron reguliert werden

T-Typ-Calciumkanäle

Auf Grund der erhöhten Prävalenz für Vorhofflimmern in Probanden mit dem MRE1.3-EGFR-Promotorelement und der starken Induzierbarkeit von MRE1.3 durch MR/Aldosteron in Zellkultur, sollten anhand von EGFR-*Knock-out*-Mäusen Ionenkanäle identifiziert werden, die durch den EGFR reguliert werden, und so über eine MR-abgängige EGFR-Überexpression an der Entstehung von Vorhofflimmern beteiligt sein könnten. Hierbei konnten im Besonderen Spannungs-gesteuerte T-Typ-Calciumkanäle als putative Kandidaten detektiert werden. Die Expression dieser Calciumkanäle (Cacna1g, Cacna1h und Cacna1i) erfolgt ubiquitär im Zentralnervensystem. Zusätzlich kommen die Ionenkanäle Cacna1g im Sinusknoten sowie Cacna1h in Herz, Niere und Leber vor [301,302]. In nahezu allen Säuger-Arten werden die Calciumkanäle Cacna1g und Cacna1h stabil im embryonalen Herzen und hierbei sowohl in den Myozyten der Atrien und Ventrikel gebildet, wohingegen diese in adulten Lebewesen unter physiologischen Bedingungen stark reduziert sind oder gar nicht vorliegen [302]. Niwa et al. wiesen anhand quantitativer PCR-Analysen nach, dass die Cacna1h-mRNA im Vergleich zur Cacna1g-mRNA in Geweben früher muriner Embryoherzen wesentlich stärker exprimiert wird, wohingegen in adulten Mausherzen die Cacna1g-Expression verglichen mit der des Cacna1h-Calciumkanals dominiert [303]. Ähnliche Beobachtungen konnten im humanen Herzen beschrieben werden [304–306]. Es ist außerdem bekannt, dass die Menge an T-Typ-Calciumkanälen im Herzen im Laufe der Entwicklung zwar reduziert wird, diese jedoch unter pathophysiologischen Bedingungen in ventrikulären Zellen wieder auftauchen [302]. So konnte sowohl in Ratten als auch Mäusen demonstriert werden, dass u.a. eine Hypertrophie des Herzgewebes oder ein Herzinfarkt dazu führen kann, dass die T-Typ-Calciumkanäle wieder im Ventrikel exprimiert werden [307,308]. Funktionell werden die Spannungs-abhängigen T-Typ-Calciumkanäle durch kleine Potenziale aktiviert, erzeugen kurzlebige schwache Ströme und vermitteln den Calciuminflux nach Membrandepolarisation [309]. Strukturell handelt es um Komplexe aus Alpha-1, Alpha-2/Delta-, Beta- und Gamma-Untereinheiten im Verhältnis 1:1:1:1, wobei die Alpha-1-Untereinheit aus 24 Transmembrandomänen besteht und den Poren-bildenden Komplex darstellt (Abb. 34) [309,310].

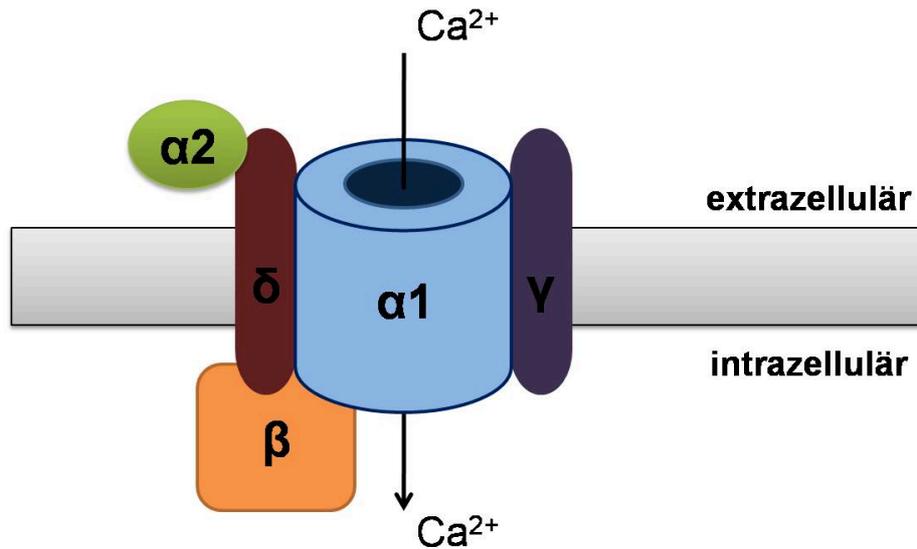


Abb. 34: Schema eines T-Typ-Calciumkanals. Dargestellt sind die Poren-bildende Alpha-1-Untereinheit sowie die Alpha-2/Delta-, Beta- und Gamma-Untereinheiten (modifiziert nach [310]).

Im Rahmen dieser Arbeit war die mRNA-Expression dieser T-Typ-Calciumkanäle in Kardiomyozyten von EGFR-*Knock-out*-Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit EGFR signifikant reduziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aldosteron-induzierte Überexpression der Ionenkanäle *Cacna1g* und *Cacna1h* im Gegensatz zu *Cacna1i* EGFR-abhängig ist. Die mittels qPCR validierten Kanäle *Cacna1h* und *Cacna1g* sind für ihre Beteiligung an der Schrittmacherfunktion im Herzen bekannt und sind dabei für das Aufrechterhalten des Sinusrhythmus mit verantwortlich [302,311,312]. Außerdem führt laut Le Quang et al. ein *Knock-out* von *Cacna1g* in Mäusen zu einer verminderten Herzfrequenz durch ein verlängertes PR-Intervall und somit zur Überleitungsstörung am AV-Knoten [313]. Diese Inaktivierung des *Canca1g*-Kanals führt neben einer Verlangsamung der Herzfrequenz zu einer Verzögerung der atrioventrikulären Erregungsleitung [314]. Es wäre daher denkbar, dass eine Überexpression des EGFR zu einer Überexpression der T-Typ-Calciumkanäle *Cacna1g* und *Cacna1h* und somit zur gesteigerten Erregbarkeit und Beschleunigung der Herzfrequenz führen könnte.

L-Typ-Calciumkanäle

Eine EGFR-abhängige Aldosteron-induzierte Überexpression des L-Typ-Calciumkanals *Cacna1c* konnte ebenfalls in den Mausherzen nachgewiesen werden. Außerdem zeigen Kardiomyozyten in EGFR-*Knock-out*-Mäusen verglichen mit EGFR-Wildtyp-Mäusen eine verminderte Expression des Ionenkanals *Cacna1c*. Eine entscheidende Rolle von Mutationen des Spannungs-abhängigen L-Typ Calciumkanals *Cacna1c* in der Entstehung

von Arrhythmien wurde bereits für das sogenannte Brugada 3-Syndrom, Timothy Syndrom sowie das LongQT-Syndrom beschrieben [315,316]. So können Patienten mit Brugada 3-Syndrom an plötzlichem Herztod in Folge von Kammerflimmern sterben. Beim LongQT-Syndrom kommt es zu einer Verzögerung der Repolarisation, die zu ventrikulärem Flimmern führen kann [315,316]. L-Typ-Calciumkanäle vermitteln den Calciuminflux bei Membrandepolarisation, zeichnen sich aber im Gegensatz zu T-Typ-Calciumkanälen durch lang anhaltende Ströme aus [317].

Relevanz der T-Typ- und L-Typ-Calciumkanäle beim Vorhofflimmern

Es ist bekannt, dass sowohl L-Typ- als auch T-Typ-Calciumkanäle an der Entstehung von Vorhofflimmern beteiligt sein können. Die Dauer des Aktionspotenzials wird normalerweise durch Veränderungen der Ionenleitfähigkeit von Natrium-, Calcium- und Kaliumionenkanälen in der Membran bestimmt. Strukturelles und elektrisches Remodeling des Atriums können sowohl zu Verkürzungen (i) als auch Verlängerungen (ii) des Aktionspotenzials führen, was die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigt. (i) Verkürzen sich die Dauer des Aktionspotenzials sowie die refraktäre Phase, so kann dies zu anhaltender schneller Aktivierung des Atriums führen [197,318–320]. Durch diese andauernde schnelle Aktivierung wird der über die L-Typ-Calciumkanäle vermittelte Calciumeinstrom reduziert, und der nach außen gerichtete Kaliumstrom verstärkt [318]. Eine das Vorhofflimmern begünstigende Verkürzung des Aktionspotenzials wurde weiterhin mit einem reduzierten Calciuminflux assoziiert, welcher durch die funktionelle Inaktivierung von L-Typ-Calciumkanälen bewirkt wird. So spielt eine Steigerung der S-Nitrosylierung von Calciumkanälen beim Vorhofflimmern eine entscheidende Rolle [318,321]. (ii) Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Unregelmäßigkeiten in der Calcium-Regulation, wie zum Beispiel ein Überschuss an Calcium-Ionen, zu verspäteten Folgedepolarisationen führen können und bei Überschreitung der Reizschwelle einzelne oder permanente Tachykardien verursachen [197,276,318]. Eine Überexpression des L-Typ-Calciumkanals *Cacna1c* und ein dadurch bedingter verstärkter Einstrom von Calciumionen könnten einen solchen Überschuss an Calciumionen bewirken. Eine Verlängerung des Aktionspotenzials kann außerdem zu verfrühten Folgedepolarisationen führen, die eine Regeneration der inaktivierten Calciumkanäle bewirkt und in Folge dessen eine abnormale Depolarisation auf Plateuniveau erlaubt. Solche Verlängerungen der Aktionspotenziale sind aus ventrikulären Herzrhythmusstörungen, wie dem LongQT-Syndrom, bekannt, wurden aber auch in den Vorhöfen beschrieben [322].

Ein Zusammenhang der Steuerung von Calciumkanälen durch eine MR/Aldosteron-EGFR-Wechselwirkung im Zusammenhang mit Vorhofflimmern konnte bereits in Ratten beschrieben werden. Ventrikuläre Ratten-Myozyten zeigen nach Behandlung mit Aldosteron

im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Intensität der L-Typ- und T-Typ-Calciumströme, sowie eine erhöhte Expression der Porenkomplex-bildenden alpha1c- und beta2- Untereinheiten [194,195]. Außerdem erfolgte der Nachweis, dass der Aldosteron-Antagonist Spironolakton zu einer Hemmung des AngII -induzierten Calciumeinstroms führt, wobei der Effekt durch Aldosteron aufgehoben wird. Dies zeigt, dass die intrazellulären Effekte des Angiotensin II auf den Calciuminflux z.T. durch den MR vermittelt werden [323]. Es wird weiterhin beschrieben, dass Ang II die verspätete Folgedepolarisation von isolierten Kardiomyozyten der Lungenvene direkt induziert und dadurch den automatischen Rhythmus beschleunigt. Diese Zellen sind als wichtige Quelle für ektopische Schläge und Signalfolgen des Vorhofflimmerns bekannt [324]. Es wäre daher denkbar, dass die Angiotensin II-induzierten Effekte über den EGFR vermittelt werden und die Unterschiede in der Aktivierung des EGFR-Promotors zu einer unterschiedlichen Angiotensin II-vermittelten Expression und/oder Aktivierung der identifizierten Calciumkanäle führt und so zu einer erhöhten Prävalenz für die Entstehung von Vorhofflimmern in Probanden mit MRE1.3. Hierbei scheint besonders die Regulation von T-Typ-Calciumkanälen eine Rolle zu spielen. Eine Behandlung von Vorhof-Dysfunktionen konnte bereits beschrieben werden. So unterdrückt die Anwendung von T-Typ-Calciumkanal-Blockern wie Mibefradil und Amiodaron das Remodeling der Vorhöfe und reduziert die Entstehung von Vorhofflimmern, wohingegen keine Effekte von L-Typ-Calciumkanal-, Natriumkanal- oder Kaliumkanalblockern nachgewiesen wurden [196,325].

4.5.3.2. Ionenkanäle, die EGFR-abhängig durch MR/Aldosteron reguliert werden und durch den Calciumspiegel beeinflusst werden können

Accn1

Neben den Calciumkanälen konnte eine signifikante EGFR-abhängige MR/Aldosteron-induzierte Regulation des Amilorid-sensitiven Natriumkanals Accn1 nachgewiesen werden. Dieser gehört zur DEG/ENaC-Familie und wird u.a. durch Calcineurin reguliert. Eine Hemmung von Accn1 wird durch die Calcineurin-abhängige Dephosphorylierung erzielt. In CHO-Zellen erfolgte der Nachweis, dass dies unter pathologischen Bedingungen zu einer Überladung mit Calciumionen führt [326], was die Entstehung von Vorhofflimmern, wie oben beschrieben, begünstigen kann.

Trpv2

Bei den Kationenkanälen der TRPV-Familie (Transient Receptor Potential Cation Channel subfamily V) handelt es sich um Calcium-permeable Kationenkanäle. Mit Trpv2 wurde ein Ionenkanal identifiziert, dessen Überexpression EGFR-abhängig durch Aldosteron in EGFR-Wildtyp-Tieren induziert wird. Für Trpv2 konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation unter physiologischen Bedingungen zu einer verbesserten Herzfähigkeit führt und der Antagonist

Probenicid in isolierten Kardiomyozyten zu einem Trpv2-abhängigen zytosolischen Calciuminflux und in Folge dessen zu einer erhöhten Zellkontraktilität führt [327]. Durch den EGFR-abhängigen Aldosteron-induzierten Mechanismus könnte die Überexpression zu einer übermäßigen Kontraktilität des Herzens und zur Begünstigung von Herzrhythmusstörungen führen.

4.5.3.3. Ionenkanäle, die durch MR/Aldosteron unabhängig vom EGFR reguliert werden

Chloridkanäle (Clnc3 und Clnc7)

Neben den beschriebenen Calciumkanälen konnten in den Kardiomyozyten von EGFR-KO-Mäusen im Vergleich zu EGFR-WT-Mäusen signifikante Expressionsunterschiede der Chloridkanäle Clnc3 und Clnc7 nachgewiesen werden, wobei keine signifikanten EGFR-abhängigen Aldosteron-Effekte detektiert wurden. Zu beachten ist dabei, dass eine Untersuchung der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von Chloridkanälen im Herzen schwierig ist, da kompensatorische Mechanismen als Antwort auf Genmanipulationen die Analysen erschweren [328,329]. Bei Clnc3 und Clnc7 handelt es sich um Calcium-aktivierte Chloridkanäle. Clnc3 ist ein Volumen-gesteuerter Chloridkanal, der aus hypoxischen und ischämischen Herzmuskelzellen bekannt ist. So führen diese Bedingungen zu einem Anschwellen der Zellen und Aktivierung der Volumen-gesteuerten Chloridkanäle. Diese Aktivierung bewirkt eine Verkürzung der Dauer des Aktionspotenzials und einer Verkürzung der refraktären Phase, was das Vorhofflimmern begünstigt [319,320,330,331]. Ein Einfluss von Clnc7 auf die Entstehung von Vorhofflimmern konnte bisher noch nicht beschrieben werden. Kompensatorische Mechanismen können die Ursache dafür sein, dass es bei Reduktion der Clnc3-Expression gleichzeitig zu einer Erhöhung der Clnc7-Expression kommt.

Trpv4

Auch der nicht-selektive Calcium-permeable Kationenkanal Trpv4, welcher Calmodulin-abhängig reguliert wird, führt nach Aktivierung zu einem Calciuminflux und ist in die Regulation von osmotischem Stress involviert. Patienten mit Vorhofflimmern zeigen eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche in das kardiale Remodeling sowie kardiale Dysfunktionen involviert ist [332,333]. Weiterhin gilt oxidativer Stress als entscheidender Faktor für ein strukturelles Remodeling der Vorhöfe [276,334]. Es ist bekannt, dass Aldosteron kardialen oxidativen Stress fördern kann und so zur Inflammation und Fibrose der Vorhöfe beiträgt. Da die Gabe von Aldosteron sowohl in Herzen von EGFR-KO- als auch EGFR-WT-Tieren zu einer signifikanten Überexpression von Trpv4 führt, handelt es sich um einen EGFR-unabhängigen Mechanismus.

Kcnn2

Neben den bereits beschriebenen Ionenkanälen, die entweder nur in EGFR-WT-Mäusen EGFR-abhängig oder EGFR-unabhängig sowohl in EGFR-KO- als auch EGFR-WT-Tieren durch Aldosteron überexprimiert werden, stellt Kcnn2 (SK2, Potassium Intermediate/Small Conductance Calcium-Activated Channel, Subfamily N, Member 2) eine Besonderheit dar, da dieser bei Aldosterongabe in EGFR-KO-Mäusen überexprimiert wurde. Kcnn2 ist ein spannungs-abhängiger Ca^{2+} -aktivierter Kaliumkanal mit niedrigem Einzelkanalleitwert [335], der hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird. Der Nachweis dieser Kanäle in Kardiomyozyten von Mensch und Maus erfolgte durch Xu et al und später Li et al., die ebenfalls zeigen konnten, dass Kcnn2 hauptsächlich in den Vorhöfen exprimiert wird [336,337]. Kcnn2-*Knock-out*-Mäuse zeigen eine verspätete kardiale Repolarisation und infolgedessen Arrhythmien der Vorhöfe [337]. Die Entstehung von chronischem Vorhofflimmern könnte auf elektrischem Remodeling, welches auf eine verminderte Expression von Kcnn2 und Kcnn1 zurückzuführen ist, beruhen [338]. Desweiteren wurde auf dem Kcnn2-Promotor ein Glukokortikoid-responsives Element (GRE) identifiziert, welches sowohl durch MR/Aldosteron als auch Hydrocortison/GR aktiviert, und durch die entsprechenden Inhibitoren Spironolakton und Mifepriston gehemmt werden konnte [339]. Eine durch MR/Aldosteron-induzierte Überexpression des Kcnn2-Ionenkanal-Typs war im Rahmen dieser Dissertation nur in EGFR-*Knock-out*-Mäusen möglich, ist daher EGFR-unabhängig und für den untersuchten Mechanismus nicht relevant.

Trpm7:

Für Trpm7 (Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M, Member 7) konnte mittels qPCR sowohl in EGFR-KO- als auch EGFR-WT-Mäusen eine signifikante Aldosteron-induzierte Überexpression nachgewiesen werden. Trpm7 ist ein Ionenkanal, der sowohl für Calcium- als auch Magnesiumionen permeabel ist und mit seiner α -Kinase-Domäne gleichzeitig als Enzym wirken kann. Für diesen Ionenkanal konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass in Fibroblasten der Atrien von Patienten mit Vorhofflimmern sowohl eine Erhöhung der Trpm7-Rezeptor-Menge als auch des dadurch vermittelten Calciuminflux vorliegt [340,341]. In vergangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Aldosteron eine Rolle für die Trpm7-Signalkaskaden spielt [342,343]. So wurde beschrieben, dass Aldosteron in Zellkultur zu einer erhöhten Aktivierung des Trpm7-Ionenkanals bei unveränderter Menge des Gesamtproteins führt [342]. Da die MR/Aldosteron-induzierte Überexpression des Trpm7-Ionenkanals im Rahmen dieser Dissertation sowohl in EGFR-KO-Mäusen als auch EGFR-WT-Mäusen möglich war, handelt es sich um einen EGFR-unabhängigen Effekt und ist daher für den untersuchten Mechanismus nicht relevant.

Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Mit der Identifikation des Mineralokortikoid-responsiven Elements MRE1.3 sowie dem Nachweis der SP1-Abhängigkeit der MR/Aldosteron-induzierten Überexpression des EGFR konnte eine wichtige Interaktion des pathophysiologischen Zusammenspiels von MR und EGFR näher charakterisiert werden. Der genaue Mechanismus der Interaktion von MR und SP1 am MRE1.3 muss dabei in Zukunft noch weiter untersucht werden und bleibt zunächst unklar. Mit Hilfe der Kohorten-Studien und der molekularen Charakterisierung der verschiedenen SNPs des MRE1.3-Promotorelements war es möglich, anhand der erhöhten Prävalenz für Vorhofflimmern bei Probanden mit der MRE1.3-Variante eine mögliche pathophysiologische Relevanz des identifizierten Mechanismus zu verdeutlichen. Außerdem konnten durch die Eingrenzung von putativen Zielgenen der MR-EGFR-Interaktion im Herzen, die Ionenkanäle *Cacna1c*, *Cacna1g*, *Cacna1h*, *Trpv2* und *Accn1* identifiziert werden, deren Expression in Abhängigkeit des EGFR durch MR/Aldosteron verändert wird. Funktionelle Analysen müssen zukünftig in Form von Patch-Clamp-Analysen Aufschluss darüber geben, ob eine Veränderung der Ionenkanal-Expression ebenfalls zu Veränderungen der Ionenströme (elektrisches Remodeling) in den Vorhöfen führt, was die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigen könnte.

Bei allen identifizierten EGFR-abhängigen MR/Aldosteron-regulierten Ionenkanälen handelt es sich um Kanäle, die den Calciuminflux vermitteln, oder aber um Calcium-modulierte Ionenkanäle. Auf Grund der unterschiedlichen MR/Aldosteron-abhängigen Aktivierbarkeit der verschiedenen MRE1.3-Promotorvarianten kann die unterschiedliche Prävalenz des Vorhofflimmerns teilweise erklärt werden. So werden in Probanden mit dem MRE1.3-Promotorelement auf Grund der hohen Reaktivierbarkeit durch MR/Aldosteron, pro-fibrotische und pro-entzündliche Veränderungen des Vorhofgewebes begünstigt. Außerdem kann die starke Aktivierung des MRE1.3-Promotors und die daraus resultierende Überexpression des EGFR nach dieser Hypothese zu einer erhöhten Expression von Calcium-leitenden oder Calcium-abhängigen Ionenkanälen führen, was die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigen kann. Weitere Analysen, wie z.B. Patch-Clamp-Experimente in Myozyten der Atrien von EGFR-*Knock-out*- und EGFR-Wildtyp-Mäusen, können weiteren Aufschluss über die Beteiligung der Ionenkanäle an der Entstehung von Vorhofflimmern geben und sollen in weiterführenden Arbeiten angeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Promotion konnte auf dem Promotor des Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) in der Region -228 bis -163 ein Mineralokortikoid-responsives Element identifiziert werden, welches als MRE1.3 bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei um ein 65 bp langes Promotorelement, welches spezifisch durch den Aldosteron-gebundenen Mineralokortikoidrezeptor (MR), jedoch nicht durch den Glukokortikoidrezeptor (GR), aktiviert wird. Der Transkriptionsfaktor SP1 wurde außerdem als entscheidender Kofaktor für die MR/Aldosteron-induzierte Aktivierung des MRE1.3 identifiziert. Eine direkte Bindung von SP1 an MRE1.3 wurde mittels EMSA nachgewiesen. Weiterhin bindet der MR nur in Anwesenheit von SP1 an MRE1.3 und führt so zur Aldosteron-induzierten Expression des EGFR. Die Hemmung von SP1 durch einen chemischen Inhibitor (WP631) oder spezifische SP1-siRNA bewirkt die Reduktion der MR/Aldosteron-induzierten MRE1.3-Aktivierung und daraus resultierend eine Verringerung der EGFR-Expression sowohl in Zellkultur als auch Primärkultur. Eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors SP3, welcher ein gemeinsames Bindemotiv mit SP1 teilt, konnte für den identifizierten Mechanismus ausgeschlossen werden. So zeigt eine SP3-siRNA vermittelte Reduktion der SP3-Proteinmenge keinen Einfluss auf die MR/Aldosteron-induzierte Expression des MRE1.3-Promotorelementes.

Im Rahmen der EGFR-Promotorstudien wurden innerhalb des MRE1.3-Promotorelements außerdem zwei SNPs, rs712830 (-191 C/A; MRE1.3-SNP1) sowie rs712829 (-216 G/T; MRE1.3-SNP2), identifiziert, die auf Grund der nachgewiesenen Relevanz von MRE1.3 und SP1 für die MR/Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung hinsichtlich ihrer MR-induzierten Aktivierung charakterisiert wurden. Hierbei konnte anhand von 2 Kohortenstudien (CARLA und SHIP) eine Korrelation der MRE1.3-SNPs mit der Prävalenz für Vorhofflimmern nachgewiesen werden. So zeigen Probanden mit dem MRE1.3-Promotorelement im Vergleich zu Probanden mit MRE1.3-SNP1 (-191 C/A) oder MRE1.3-SNP2 (-216 G/T) eine 2-fach höhere Wahrscheinlichkeit, an Vorhofflimmern zu erkranken. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass MRE1.3 im Vergleich zu den beiden anderen SNPs eine signifikant höhere MR/Aldosteron-induzierte Promotoraktivierung zeigt, wohingegen MRE1.3-SNP1 und -SNP2 eine deutlich niedrigere Aldosteron-abhängige Aktivierbarkeit zeigen. Auch bindet SP1 aus Zellkernextrakten aus HEK293-Zellen, die mit MR transfiziert und Aldosteron inkubiert wurden, nur an MRE1.3, wohingegen keine spezifische Bindung an MRE1.3-SNP1 oder -SNP2 detektiert werden konnte.

Eine erste Eingrenzung der EGFR-abhängigen Aldosteron-induzierten Ionenkanäle, die an der Entstehung von Vorhofflimmern beteiligt sein könnten, erfolgte im Mausmodell anhand von EGFR-WT und EGFR-KO-Tieren. So wurden die T-Typ-Calciumkanäle *Cacna1g* und *Cacna1h*, der L-Typ-Calciumkanal *Cacna1c*, sowie die Calcium-modulierten Ionenkanäle

Accn1, Kcnn2 und Trpv2 identifiziert, wobei die T-Typ-Calciumkanäle durch ihre Beteiligung an der Schrittmacherfunktion im Herzen am vielversprechendsten erscheinen. Eine Validierung dieser Kanäle soll anhand von Patch-Clamp-Analysen und weiterführenden Arbeiten im Tiermodell erfolgen, um den Mechanismus der Entstehung von Vorhofflimmern weiter aufzuklären.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur Heart J* 2013;34:3028–34.
- [2] Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, et al. European cardiovascular disease statistics 2012. Eur Hear Network, Brussels, Eur Soc Cardiol Sophia Antip 2012.
- [3] Chauhan U. Cardiovascular disease prevention in primary care. *Br Med Bull* 2007;81-82:65–79.
- [4] Epstein M. Aldosterone as a determinant of cardiovascular and renal dysfunction. *J R Soc Med* 2001;94:378–83.
- [5] Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme E a G, Polly ML, McMahon EG. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 2003;63:1791–800.
- [6] Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120:893–901.
- [7] Pitt B, Zannad F, Remme W. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999;341:709–17.
- [8] Pitt B, Remme W, Zannad F. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309–21.
- [9] Zannad F, McMurray J. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011;364:11–21.
- [10] Dorrance AM, Rupp NC, Nogueira EF. Mineralocorticoid receptor activation causes cerebral vessel remodeling and exacerbates the damage caused by cerebral ischemia. *Hypertension* 2006;47:590–5.
- [11] Florian J a, Dorrance a, Webb RC, Watts SW. Mineralocorticoids upregulate arterial contraction to epidermal growth factor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R878–86.
- [12] Northcott C, Florian J a., Dorrance a., Watts SW. Arterial Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension. *Hypertension* 2001;38:1337–41.
- [13] Kloet E de, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease 1. *Endocr Rev* 1998;19:269–301.
- [14] Funder J. Mineralocorticoid receptors in the central nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;56:179–83.
- [15] Funder JW. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 2005;26:313–21.
- [16] Chen SY, Bhargava a, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, et al. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2514–9.
- [17] Xiao F, Puddefoot JR, Vinson GP. Aldosterone mediates angiotensin II-stimulated rat vascular smooth muscle cell proliferation. *J Endocrinol* 2000;165:533–6.
- [18] Nishiyama A, Yao L, Fan Y, Kyaw M, Kataoka N, Hashimoto K, et al. Involvement of aldosterone and mineralocorticoid receptors in rat mesangial cell proliferation and deformability. *Hypertension* 2005;45:710–6.
- [19] Terada Y, Kobayashi T, Kuwana H, Tanaka H, Inoshita S, Kuwahara M, et al. Aldosterone stimulates proliferation of mesangial cells by activating mitogen-activated protein kinase 1/2, cyclin D1, and cyclin A. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2296–305.
- [20] Morrison N, Harrap SB, Arriza JL, Boyd E, Connor JM. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum Genet* 1990;85:130–2.
- [21] Zennaro M, Kotelevtsev Y, Gerard S, Soubrier F, Fuller PJ, Keightley M, et al. Nucleic Acids , Protein Synthesis , and Molecular Genetics: Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms. *J Biol Chem* 1995;270:21016–20.

- [22] Zennaro MC, Le Menuet D, Lombès M. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol Endocrinol* 1996;10:1549–60.
- [23] Le Menuet D. Targeted Oncogenesis Reveals a Distinct Tissue-specific Utilization of Alternative Promoters of the Human Mineralocorticoid Receptor Gene in Transgenic Mice. *J Biol Chem* 2000;275:7878–86.
- [24] Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889–95.
- [25] Gronemeyer H, Gustafsson J-A, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:950–64.
- [26] Walther RF, Atlas E, Carrigan A, Rouleau Y, Edgecombe A, Visentin L, et al. A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem* 2005;280:17549–61.
- [27] Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol* 2005;19:2211–21.
- [28] Fuse H, Kitagawa H, Kato S. Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Mol Endocrinol* 2000;14:889–99.
- [29] Pippal JB, Fuller PJ. Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 2008;41:405–13.
- [30] Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987;237:268–75.
- [31] Luisi BF, Xu W, Otwinowski Z. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991;352:497–505.
- [32] Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:12480–4.
- [33] Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 2001;11:1749–58.
- [34] Savory J, Préfontaine G. Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol* 2001;21:781–93.
- [35] Tetel MJ, Jung S, Carbajo P, Ladtkow T, Skafar DF, Edwards DP. Hinge and amino-terminal sequences contribute to solution dimerization of human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 1997;11:1114–28.
- [36] Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, et al. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4904–9.
- [37] Shiau a K, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard D a, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998;95:927–37.
- [38] Williams S, Sigler P. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 1998;393:3–5.
- [39] Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 2002;110:93–105.
- [40] Fagart J, Huyet J, Pinon GM, Rochel M, Mayer C, Rafestin-Oblin M-E. Crystal structure of a mutant mineralocorticoid receptor responsible for hypertension. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:554–5.
- [41] Li Y, Suino K, Daugherty J, Xu HE. Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Mol Cell* 2005;19:367–80.
- [42] Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997;18:306–60.

- [43] Bruner K, Derfoul A. The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct* 1997;7:85–98.
- [44] Couette B, Jalaguier S, Hellal-Levy C, Lupo B, Fagart J, Auzou G, et al. Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 1998;12:855–63.
- [45] Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 2007;5:e012.
- [46] Lombès M, Binart N, Delahaye F, Baulieu EE, Rafestin-Oblin ME. Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem J* 1994;302 (Pt 1):191–7.
- [47] Hultman ML, Krasnoperova N V, Li S, Du S, Xia C, Dietz JD, et al. The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol Endocrinol* 2005;19:1460–73.
- [48] Lim-Tio SS, Keightley MC, Fuller PJ. Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 1997;138:2537–43.
- [49] Glass C, Rosenfeld M. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000;14:121–41.
- [50] Meijer OC, Kalkhoven E, van der Laan S, Steenbergen PJ, Houtman SH, Dijkmans TF, et al. Steroid receptor coactivator-1 splice variants differentially affect corticosteroid receptor signaling. *Endocrinology* 2005;146:1438–48.
- [51] Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ, Lombès M. The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol Endocrinol* 2005;19:1158–69.
- [52] Kitagawa H, Yanagisawa J. Ligand-selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol* 2002;22:3698–706.
- [53] Pascual-Le Tallec L, Kirsh O, Lecomte M-C, Viengchareun S, Zennaro M-C, Dejean A, et al. Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Mol Endocrinol* 2003;17:2529–42.
- [54] Yokota K, Shibata H, Kobayashi S, Suda N, Murai A, Kurihara I, et al. Proteasome-Mediated Mineralocorticoid Receptor Degradation Attenuates Transcriptional Response to Aldosterone. *Endocr Res* 2004;30:611–6.
- [55] Rogerson FM, Dimopoulos N, Sluka P, Chu S, Curtis AJ, Fuller PJ. Structural Determinants of Aldosterone Binding Selectivity in the Mineralocorticoid Receptor Structural Determinants of Aldosterone Binding Selectivity in the Mineralocorticoid Receptor *. *J Biol Chem* 1999;274:36305–11.
- [56] Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;280:F181–92.
- [57] Funder J, Pearce P, Smith R, Smith A. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science (80-)* 1988;242:583–5.
- [58] Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1977;57:313–70.
- [59] Weber K. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1689–97.
- [60] Lin D, Sugawara T, Strauss J, Clark B. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science (80-)* 1995;267:1828–31.
- [61] Patel BM, Mehta A a. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol* 2012;697:1–12.
- [62] Casey, Linette M. and MacDonald PC. Extraadrenal Formation of a Mineralocorticosteroid: Decorticosterone and Deoxycorticosterone Sulfate Biosynthesis and Metabolism. *Endocr Rev* 1982;3:396–403.
- [63] Silvestre J-S, Heymes C, Oubenaissa a., Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon a., et al. Activation of Cardiac Aldosterone Production in Rat Myocardial Infarction : Effect of Angiotensin II Receptor Blockade and Role in Cardiac Fibrosis. *Circulation* 1999;99:2694–701.

- [64] Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T. Synthesis of corticosterone in the vascular wall. *Endocrinology* 1994;135:8–11.
- [65] Danser a HJ. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:759–68.
- [66] Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2985–91.
- [67] De Mello WC, Frohlich ED. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. *Peptides* 2011;32:1774–9.
- [68] Leung PS, Chappell MC. A local pancreatic renin-angiotensin system: endocrine and exocrine roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:838–46.
- [69] Leung PS. The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *J Physiol* 2007;580:31–7.
- [70] De Mello WC, Danser a. HJ. Angiotensin II and the Heart : On the Intracrine Renin-Angiotensin System. *Hypertension* 2000;35:1183–8.
- [71] Boddi M, Poggesi L, Coppo M, Zarone N, Sacchi S, Tania C, et al. Human Vascular Renin-Angiotensin System and Its Functional Changes in Relation to Different Sodium Intakes. *Hypertension* 1998;31:836–42.
- [72] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, et al. Role of the Renin-Angiotensin System in Vascular Diseases: Expanding the Field. *Hypertension* 2001;38:1382–7.
- [73] Engeli S, Negrel R, Sharma a M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;35:1270–7.
- [74] Allen AM, Chai SY, Sexton PM, Lewis SJ, Verberne AJ, Jarrott B, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the medulla oblongata. *Hypertension* 1987;9:III198–I205.
- [75] Allen AM, Chai SY, Clevers J, McKinley MJ, Paxinos G, Mendelsohn FA. Localization and characterization of angiotensin II receptor binding and angiotensin converting enzyme in the human medulla oblongata. *J Comp Neurol* 1988;269:249–64.
- [76] Aguilera G, Millan MA, Harwood JP. Angiotensin II receptors in the gonads. *Am J Hypertens* 1989;2:395–402.
- [77] Bruneval P, Hinglais N, Alhenc-Gelas F, Tricottet V, Corvol P, Menard J, et al. Angiotensin I converting enzyme in human intestine and kidney. Ultrastructural immunohistochemical localization. *Histochemistry* 1986;85:73–80.
- [78] Shorning BY, Jardé T, McCarthy A, Ashworth A, de Leng WWJ, Offerhaus GJ a, et al. Intestinal renin-angiotensin system is stimulated after deletion of Lkb1. *Gut* 2012;61:202–13.
- [79] Paul M, Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006:747–803.
- [80] Lombès M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N, Bonvalet JP. Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 1992;71:503–10.
- [81] Gomez-Sanchez E. Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: minority rule? *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:179–87.
- [82] Brilla C, Weber K. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992;120:893–901.
- [83] Funder JW. Steroids, hypertension and cardiac fibrosis. *Blood Press Suppl* 1995;2:39–42.
- [84] Rossi GP, Sacchetto A, Pavan E, Palatini P, Graniero GR, Canali C, et al. Remodeling of the Left Ventricle in Primary Aldosteronism Due to Conn's Adenoma. *Circ* 1997;95 :1471–8.
- [85] Tanabe A, Naruse M, Naruse K, Hase M, Yoshimoto T, Tanaka M, et al. Left ventricular hypertrophy is more prominent in patients with primary aldosteronism than in patients with other types of secondary hypertension. *Hypertens Res* 1997;20:85–90.
- [86] Milliez P, Girerd X, Plouin P-F, Blacher J, Safar ME, Mourad J-J. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1243–8.

- [87] Nagarajan V, Chamsi-Pasha M, Tang WHW. The role of aldosterone receptor antagonists in the management of heart failure: an update. *Cleve Clin J Med* 2012;79:631–9.
- [88] Young M, Funder JW. Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology* 2004;145:3153–7.
- [89] Brilla C, Zhou G, Matsubara L, Weber K. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol ...* 1994;26:809–20.
- [90] Young MJ, Moussa L, Dilley R, Funder JW. Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology* 2003;144:1121–5.
- [91] Rocha R, Stier CT, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* 2000;141:3871–8.
- [92] Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak D a, Kekec BK, Blomme E a G, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1802–10.
- [93] Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002;161:1773–81.
- [94] Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme E a G, Goellner JJ, et al. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 2003;93:69–76.
- [95] Le Menuet D, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Zennaro M-C, Lombès M. Expression and function of the human mineralocorticoid receptor: lessons from transgenic mouse models. *Mol Cell Endocrinol* 2004;217:127–36.
- [96] Liu SL, Schmuck S, Chorazyczewski JZ, Gros R, Feldman RD. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation* 2003;108:2400–6.
- [97] Arima S, Kohagura K, Xu H-L, Sugawara A, Uruno A, Satoh F, et al. Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole. *Hypertension* 2004;43:352–7.
- [98] Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:46–56.
- [99] Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets. *Mol Cell Endocrinol* 2012;350:223–34.
- [100] Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B, et al. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* 2005;19:1697–710.
- [101] Wehling M, Käsmayr J, Theisen K. Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am J Physiol* 1991;260:E719–26.
- [102] Gros R, Ding Q, Sklar L a, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, et al. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension* 2011;57:442–51.
- [103] Gros R, Ding Q, Liu B, Chorazyczewski J, Feldman RD. Aldosterone mediates its rapid effects in vascular endothelial cells through GPER activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013;304:C532–40.
- [104] Brailoiu GC, Benamar K, Arterburn JB, Gao E, Rabinowitz JE, Koch WJ, et al. Aldosterone increases cardiac vagal tone via GPER activation. *J Physiol* 2013;591:4223–35.
- [105] Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:3–9.
- [106] Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5268–72.
- [107] Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrase G. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984;307:521–7.
- [108] Ullrich A, Coussens L, Hayflick J, Dull T. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984;309:418–25.

- [109] Kondo I, Shimizu N. Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet* 1983;35:9–14.
- [110] Haley J, Whittle N, Bennet P. The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res* 1987;1:375–96.
- [111] Callaghan T, Antczak M, Flickinger T. A complete description of the EGF-receptor exon structure: implication in oncogenic activation and domain evolution. *Oncogene* 1993;11:2939–48.
- [112] Lax I, Bellot F, Howk R, Givol D, Schlessinger J. Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken / human receptor molecules. *EMBO J* 1989;8:421–7.
- [113] Garrett TPJ, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, et al. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002;110:763–73.
- [114] Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim J-H, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002;110:775–87.
- [115] Kumagai T. Role of extracellular subdomains of p185c-neu and the epidermal growth factor receptor in ligand-independent association and transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9220–5.
- [116] Bazley L a, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family. *Endocr Relat Cancer* 2005;12 Suppl 1:S17–27.
- [117] Yamabhai M, Anderson RGW. Second cysteine-rich region of epidermal growth factor receptor contains targeting information for caveolae/rafts. *J Biol Chem* 2002;277:24843–6.
- [118] Voldborg B. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197–206.
- [119] Roepstorff K, Grøvdal L, Grandal M, Lerdrup M, van Deurs B. Endocytic downregulation of ErbB receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol* 2008;129:563–78.
- [120] Schulze WX, Deng L, Mann M. Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 2005;1:2005.0008.
- [121] Huang Y, Chang Y. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Phosphorylation, Signaling and Trafficking in Prostate Cancer. *Tech* 1999;4.
- [122] Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich a. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:11–31.
- [123] Burgess A, Cho H, Eigenbrot C. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;12:541–52.
- [124] Dawson JP, Berger MB, Lin C, Schlessinger J, Lemmon MA, Ferguson KM. Epidermal Growth Factor Receptor Dimerization and Activation Require Ligand-Induced Conformational Changes in the Dimer Interface. *Mol Cell Biol* 2005;25:7734–42.
- [125] Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993;62:515–41.
- [126] Stern D, Kamps M. EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions. *EMBO J* 1988;7:995–1001.
- [127] Goldman R, Levy RB, Peles E, Yarden Y. Heterodimerization of the erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells: a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry* 1990;29:11024–8.
- [128] Kokai Y, Myers JN, Wada T, Brown VI, LeVea CM, Davis JG, et al. Synergistic interaction of p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 1989;58:287–92.
- [129] Alimandi M, Wang LM, Bottaro D, Lee CC, Kuo a, Frankel M, et al. Epidermal growth factor and betacellulin mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. *EMBO J* 1997;16:5608–17.
- [130] Graus-Porta D, Beerli RR, Hynes NE. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 1995;15:1182–91.

- [131] Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647–55.
- [132] Summerfield AE, Hudnall AK, Lukas TJ, Guyer CA, Staros J V. Identification of Residues of the Epidermal Growth Factor Receptor Proximal to Residue 45 of Bound Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 1996;271:19656–9.
- [133] Tzahar E, Pinkas-Kramarski R, Moyer JD, Klapper LN, Alroy I, Levkowitz G, et al. Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *EMBO J* 1997;16:4938–50.
- [134] Zhang H, Berezov A, Wang Q. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 2007;117:2051–8.
- [135] Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Syst Biol* 2005;1:2005.0010.
- [136] Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11–22.
- [137] Hilger R, Scheulen M, Strumberg D. The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* 2002;25:511–8.
- [138] Terai K, Matsuda M. Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Rep* 2005;6:251–5.
- [139] Zarich N, Oliva J, Martínez N. Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1. *Mol Biol ...* 2006;17:3591–7.
- [140] Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2011;2:195–209.
- [141] Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* 2006;58:621–31.
- [142] Roskoski R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 2012;66:105–43.
- [143] Minden a, Lin a, Claret FX, Abo a, Karin M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 1995;81:1147–57.
- [144] Tassi E, Biesova Z, Di PP, Gutkind JS, Wong WT, Paolo P, et al. Human JIK , a Novel Member of the STE20 Kinase Family That Inhibits JNK and Is Negatively Regulated by Epidermal Growth Factor Human JIK , a Novel Member of the STE20 Kinase Family That Inhibits JNK and Is Negatively Regulated by Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 1999;274:33287–95.
- [145] Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M, Nakamura H, Matsuda M, Vuori K. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15394–9.
- [146] Bjorge JD, Chan TO, Antczak M, Kung HJ, Fujita DJ. Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3816–20.
- [147] Rodrigues G a, Falasca M, Zhang Z, Ong SH, Schlessinger J. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol* 2000;20:1448–59.
- [148] Biswas DK, Cruz a P, Gansberger E, Pardee a B. Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8542–7.
- [149] Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004;23:7906–9.
- [150] Irby RB, Yeatman TJ. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 2000;19:5636–42.
- [151] Maa MC, Leu TH, McCarley DJ, Schatzman RC, Parsons SJ. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6981–5.
- [152] Tice D a, Biscardi JS, Nickles a L, Parsons SJ. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1415–20.

- [153] Goi T, Shipitsin M, Lu Z, Foster D a, Klinz SG, Feig L a. An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *EMBO J* 2000;19:623–30.
- [154] Biscardi JS, Maa M-C, Tice D a., Cox ME, Leu T-H, Parsons SJ. c-Src-mediated Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor on Tyr845 and Tyr1101 Is Associated with Modulation of Receptor Function. *J Biol Chem* 1999;274:8335–43.
- [155] McEneaney V, Harvey BJ, Thomas W. Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;107:180–90.
- [156] Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E1790–800.
- [157] Meinel S, Ruhs S, Schumann K, Strätz N, Trenkmann K, Schreier B, et al. Mineralocorticoid receptor interaction with SP1 generates a new response element for pathophysiologically relevant gene expression. *Nucleic Acids Res* 2013;41:8045–60.
- [158] Krug AW, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildenerger S, Govindan M V, et al. Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem* 2003;278:43060–6.
- [159] Krug AW, Allenhöfer L, Monticone R, Spinetti G, Gekle M, Wang M, et al. Elevated mineralocorticoid receptor activity in aged rat vascular smooth muscle cells promotes a proinflammatory phenotype via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase and epidermal growth factor receptor-dependent pathwa. *Hypertension* 2010;55:1476–83.
- [160] Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinas. *Hypertens Res* 2005;28:925–36.
- [161] Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Husse B, Gekle M. EF domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions. *J Biol Chem* 2008;283:7109–16.
- [162] Grossmann C, Husse B, Mildenerger S, Schreier B, Schuman K, Gekle M. Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:584–90.
- [163] Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S. Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F669–79.
- [164] Mazak I, Fiebeler A, Muller DN, Park J-K, Shagdarsuren E, Lindschau C, et al. Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2004;109:2792–800.
- [165] Min L-J, Mogi M, Li J-M, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005;97:434–42.
- [166] Montezano a C, Callera GE, Yogi a, He Y, Tostes RC, He G, et al. Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1511–8.
- [167] McEneaney V, Harvey BJ, Thomas W. Aldosterone regulates rapid trafficking of epithelial sodium channel subunits in renal cortical collecting duct cells via protein kinase D activation. *Mol Endocrinol* 2008;22:881–92.
- [168] Drumm K, Kress T, Gassner B. Aldosterone stimulates activity and surface expression of NHE3 in human primary proximal tubule epithelial cells (RPTEC). *Cell Physiol Biochem* 2006;17:21–8.
- [169] De Giusti VC, Nolly MB, Yeves AM, Caldiz CI, Villa-Abrille MC, Chiappe de Cingolani GE, et al. Aldosterone stimulates the cardiac Na(+)/H(+) exchanger via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Hypertension* 2011;58:912–9.
- [170] Dorrance a M, Osborn HL, Grekin R, Webb RC. Spironolactone reduces cerebral infarct size and EGF-receptor mRNA in stroke-prone rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R944–50.
- [171] Kim J, Lee C, Park H, Kim HJ, So HH, Lee KS, et al. Full Paper Epidermal Growth Factor Induces Vasoconstriction Through the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Mitogen- Activated Protein Kinase Pathway in Hypertensive Rats. *J Pharmacol Sci* 2006;143:135–43.

- [172] Ishizawa K, Izawa Y, Ito H, Miki C, Miyata K, Fujita Y, et al. Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. *Hypertension* 2005;46:1046–52.
- [173] Yim HE, Yoo KH, Bae IS, Jang GY, Hong YS, Lee JW. Aldosterone regulates cellular turnover and mitogen-activated protein kinase family expression in the neonatal rat kidney. *J Cell Physiol* 2009;219:724–33.
- [174] Huang S, Zhang A. Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:1323–33.
- [175] Griol-Charhbil V, Fassot C, Messaoudi S, Perret C, Agrapart V, Jaisser F. Epidermal growth factor receptor mediates the vascular dysfunction but not the remodeling induced by aldosterone/salt. *Hypertension* 2011;57:238–44.
- [176] Messaoudi S, Zhang A Di, Griol-Charhbil V, Escoubet B, Sadoshima J, Farman N, et al. The epidermal growth factor receptor is involved in angiotensin II but not aldosterone/salt-induced cardiac remodeling. *PLoS One* 2012;7:e30156.
- [177] Gilbert KC, Brown NJ. Aldosterone and inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:199–204.
- [178] Limor R, Kaplan M, Sharon O, Knoll E, Naidich M, Weisinger G, et al. Aldosterone up-regulates 12- and 15-lipoxygenase expression and LDL oxidation in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 2009;108:1203–10.
- [179] Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor G a, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:16281–6.
- [180] Min L-J, Mogi M, Iwanami J, Li J-M, Sakata A, Fujita T, et al. Cross-talk between aldosterone and angiotensin II in vascular smooth muscle cell senescence. *Cardiovasc Res* 2007;76:506–16.
- [181] Sun G-P, Kohno M, Guo P, Nagai Y, Miyata K, Fan Y-Y, et al. Involvements of Rho-kinase and TGF-beta pathways in aldosterone-induced renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2193–201.
- [182] Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:174–80.
- [183] Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005;45:773–9.
- [184] Nagai Y, Miyata K, Sun G-P, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, et al. Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension* 2005;46:1039–45.
- [185] Chen J, Chen J-K, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee T-C, et al. EGFR signaling promotes TGFβ-dependent renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:215–24.
- [186] Chen D, Chen Z, Park C, Centrella M, McCarthy T, Chen L, et al. Aldosterone stimulates fibronectin synthesis in renal fibroblasts through mineralocorticoid receptor-dependent and independent mechanisms. *Gene* 2013;531:23–30.
- [187] Zhang M, Chen J, Lai L, You L, Lin S, Hao C, et al. Aldosterone promotes fibronectin synthesis in rat mesangial cells via ERK1/2-stimulated Na-H⁺ exchanger isoform 1. *Am J Nephrol* 2010;31:75–82.
- [188] Gekle M, Mildener S, Freudinger R, Grossmann C. Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. *Eur J Physiol* 2007;454:403–13.
- [189] Grossmann C. Interaktion zwischen der Signaltransduktion von Aldosteron/Mineralocorticoidrezeptor und epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2006.
- [190] Schreier B, Döhler M, Rabe S, Schneider B, Schwerdt G, Ruhs S, et al. Consequences of epidermal growth factor receptor (ErbB1) loss for vascular smooth muscle cells from mice with targeted deletion of ErbB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:1643–52.
- [191] Schreier B, Rabe S, Schneider B, Bretschneider M, Rupp S, Ruhs S, et al. Loss of epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes causes arterial hypotension and cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2013;61:333–40.
- [192] Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, Estess J, Warden MP, Gomez-Sanchez MT, et al. Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 2006;147:1343–8.

- [193] Trenkmann K. Charakterisierung des Mineralokortikoid-Responsiven Elements im EGFR-Promotor. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2013.
- [194] Bénitah JP, Vassort G. Aldosterone upregulates Ca(2+) current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1999;85:1139–45.
- [195] Lalevée N, Rebsamen MC, Barrère-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Bénitah J-P, et al. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005;67:216–24.
- [196] Farih S, Benardeau a., Thibault B, Nattel S. The T-Type Ca²⁺ Channel Blocker Mibefradil Prevents the Development of a Substrate for Atrial Fibrillation by Tachycardia-Induced Atrial Remodeling in Dogs. *Circulation* 1999;100:2191–7.
- [197] Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh Y-H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 2007;87:425–56.
- [198] Terzi F, Burtin M, Hekmati M, Federici P, Grimber G, Briand P, et al. Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest* 2000;106:225–34.
- [199] Flamant M, Tharaux P, Placier S. Epidermal growth factor receptor trans-activation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J* 2003.
- [200] Kagiya S, Qian K, Kagiya T, Phillips MI. Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 2003;41:824–9.
- [201] Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer H. Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor1. *Kidney Int* 2000;58:549–58.
- [202] Kagiya S, Eguchi S, Frank GD, Inagami T, Zhang YC, Phillips MI. Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Hypertension Are Attenuated by Epidermal Growth Factor Receptor Antisense. *Circulation* 2002;106:909–12.
- [203] Kriwacki RW, Schultz SC, Steitz T a, Caradonna JP. Sequence-specific recognition of DNA by zinc-finger peptides derived from the transcription factor Sp1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9759–63.
- [204] Schuch R, Agelopoulos K, Neumann A, Brandt B, Bürger H, Korsching E. Site-specific chromatin immunoprecipitation: a selective method to individually analyze neighboring transcription factor binding sites in vivo. *BMC Res Notes* 2012;5:109.
- [205] Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Gene Transcription. *J Biol Chem* 1988;263:6329–36.
- [206] Vallian S, Chin K, Chang K. The Promyelocytic Leukemia Protein Interacts with Sp1 and Inhibits Its Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor Promoter The Promyelocytic Leukemia Protein Interacts with Sp1 and Inhibits Its Transactivation of the Epidermal Growth Factor R. *Mol Cell Biol* 1998;18:7147–56.
- [207] Gao S-Y, Li E-M, Cui L, Lu X-F, Meng L-Y, Yuan H-M, et al. Sp1 and AP-1 regulate expression of the human gene VIL2 in esophageal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2009;284:7995–8004.
- [208] Noti JD, Reinemann BC, Petrus MN. Sp1 binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription. *Mol Cell Biol* 1996;16:2940–50.
- [209] Banks EB, Crish JF, Welter JF, R RLE. transcriptional activator elements – a role for Sp1 and AP1 binding sites. *J Biochem* 1998;68:61–8.
- [210] Chen K, Ou X-M, Wu JB, Shih JC. Transcription factor E2F-associated phosphoprotein (EAPP), RAM2/CDCA7L/JPO2 (R1), and simian virus 40 promoter factor 1 (Sp1) cooperatively regulate glucocorticoid activation of monoamine oxidase B. *Mol Pharmacol* 2011;79:308–17.
- [211] Ou X-M, Chen K, Shih JC. Glucocorticoid and androgen activation of monoamine oxidase A is regulated differently by R1 and Sp1. *J Biol Chem* 2006;281:21512–25.
- [212] Owen GI, Richer JK, Tung L, Takimoto G, Horwitz KB. Progesterone Regulates Transcription of the p21WAF1Cyclindependent Kinase Inhibitor Gene through Sp1 and CBP/p300. *J Biol Chem* 1998;273:10696–701.
- [213] Yuan H, Young CYF, Tian Y, Liu Z, Zhang M, Lou H. Suppression of the androgen receptor function by quercetin through protein-protein interactions of Sp1, c-Jun, and the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2010;339:253–62.

- [214] Petz LN, Nardulli AM. Sp1 Binding Sites and An Estrogen Response Element Half-Site Are Human Progesterone Receptor A Promoter. *Mol Endocrinol* 2014;14:972–85.
- [215] Li D, Mitchell D, Luo J, Yi Z, Cho S-G, Guo J, et al. Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology* 2007;148:4821–8.
- [216] Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997;11:1569–80.
- [217] Faresse N, Ruffieux-Daidie D, Salamin M, Gomez-Sanchez CE, Staub O. Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299:F1462–72.
- [218] Faresse N, Vitagliano J-J, Staub O. Differential ubiquitylation of the mineralocorticoid receptor is regulated by phosphorylation. *FASEB J* 2012;26:4373–82.
- [219] Martín B, Vaquero a, Priebe W, Portugal J. Bisanthracycline WP631 inhibits basal and Sp1-activated transcription initiation in vitro. *Nucleic Acids Res* 1999;27:3402–9.
- [220] Portugal J, Martín B, Vaquero A, Ferrer N, Villamarín S, Priebe W. Analysis of the effects of daunorubicin and WP631 on transcription. *Curr Med Chem* 2001;8:1–8.
- [221] Gaidarova S, Jiménez S a. Inhibition of basal and transforming growth factor-beta-induced stimulation of COL1A1 transcription by the DNA intercalators, mitoxantrone and WP631, in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 2002;277:38737–45.
- [222] Fiebeler a., Schmidt F, Muller DN, Park J-K, Dechend R, Bieringer M, et al. Mineralocorticoid Receptor Affects AP-1 and Nuclear Factor- B Activation in Angiotensin II-Induced Cardiac Injury. *Hypertension* 2001;37:787–93.
- [223] Zhao W, Ahokas R a, Weber KT, Sun Y. ANG II-induced cardiac molecular and cellular events: role of aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H336–43.
- [224] Di Zhang A, Nguyen Dinh Cat A, Soukaseum C, Escoubet B, Cherfa A, Messaoudi S, et al. Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling. *Hypertension* 2008;52:1060–7.
- [225] Viridis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone Improves Angiotensin-Induced Vascular Changes and Oxidative Stress. *Hypertension* 2002;40:504–10.
- [226] Luther J, Luo P, Wang Z, Cohen S. Aldosterone deficiency and mineralocorticoid receptor antagonism prevent angiotensin II-induced cardiac, renal, and vascular injury. *Kidney Int* 2012;82:643–51.
- [227] Courey AJ, Tjian R. Analysis of Spl In Vivo Reveals Multiple Transcriptional Domains , Including a Novel Glutamine-Rich Activation Motif. *Cell* 1988;55:887–98.
- [228] Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J* 1994;13:3843–51.
- [229] Hagen G, Dennig J, Preiss a, Beato M, Suske G. Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem* 1995;270:24989–94.
- [230] Kennett SB, Udvadia a J, Horowitz JM. Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic Acids Res* 1997;25:3110–7.
- [231] Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene* 1999;238:291–300.
- [232] Hagen G, Müller S, Beato M, Suske G. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res* 1992;20:5519–25.
- [233] Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 1991;252:809–17.
- [234] Fairall L, Schwabe J, Chapman L. The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature* 1993;366:483–7.
- [235] Kingsley C, Winoto A. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol Cell Biol* 1992;12.

- [236] Saffer JD, Jackson SP, Annarella MB. Developmental expression of Sp1 in the mouse. *Mol Cell Biol* 1991;11:2189–99.
- [237] Supp DM, Witte DP, Branford WW, Smith EP, Potter SS. Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol* 1996;176:284–99.
- [238] Udvardia AJ, Templeton DJ, Horowitz JM. Functional interactions between the retinoblastoma (Rb) protein and Sp-family members: superactivation by Rb requires amino acids necessary for growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3953–7.
- [239] Dennig J, Hagen G, Beato M, Suske G. Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J Biol Chem* 1995;270:12737–44.
- [240] Birnbaum MJ, van Wijnen a J, Odgren PR, Last TJ, Suske G, Stein GS, et al. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 1995;34:16503–8.
- [241] Lagrange J, Li Z, Fassot C, Bourhim M, Louis H, Nguyen Dinh Cat A, et al. Endothelial mineralocorticoid receptor activation enhances endothelial protein C receptor and decreases vascular thrombosis in mice. *FASEB J* 2014;28:2062–72.
- [242] Kuwahara J, Azumano M, Takeda T. Nuclear localization of transcription factor Sp1. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999:293–4.
- [243] Wang Y-T, Chuang J-Y, Shen M-R, Yang W-B, Chang W-C, Hung J-J. Sumoylation of specificity protein 1 augments its degradation by changing the localization and increasing the specificity protein 1 proteolytic process. *J Mol Biol* 2008;380:869–85.
- [244] Wang S-A, Chuang J-Y, Yeh S-H, Wang Y-T, Liu Y-W, Chang W-C, et al. Heat shock protein 90 is important for Sp1 stability during mitosis. *J Mol Biol* 2009;387:1106–19.
- [245] Ito T, Kitamura H, Uwatoko C, Azumano M, Itoh K, Kuwahara J. Interaction of Sp1 zinc finger with transport factor in the nuclear localization of transcription factor Sp1. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;403:161–6.
- [246] Wang Y-T, Yang W-B, Chang W-C, Hung J-J. Interplay of posttranslational modifications in Sp1 mediates Sp1 stability during cell cycle progression. *J Mol Biol* 2011;414:1–14.
- [247] Nishi M, Ogawa H, Ito T, Matsuda K-I, Kawata M. Dynamic changes in subcellular localization of mineralocorticoid receptor in living cells: in comparison with glucocorticoid receptor using dual-color labeling with green fluorescent protein spectral variants. *Mol Endocrinol* 2001;15:1077–92.
- [248] Piwien Pilipuk G, Vinson GP, Sanchez CG, Galigniana MD. Evidence for NL1-independent nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor. *Biochemistry* 2007;46:1389–97.
- [249] Fejes-Tóth G, Pearce D, Náray-Fejes-Tóth a. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:2973–8.
- [250] Grossmann C, Ruhs S, Langenbruch L, Mildnerberger S, Strätz N, Schumann K, et al. Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling. *Chem Biol* 2012;19:742–51.
- [251] Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Appianat M, et al. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 1989;57:1147–54.
- [252] Robertson NM, Schulman G, Karnik S, Alnemri E, Litwack G. Demonstration of nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor (MR) using an anti-MR antibody and confocal laser scanning microscopy. *Mol Endocrinol* 1993;7:1226–39.
- [253] Wang C-H, Davamani F, Sue S-C, Lee S-C, Wu P, Tang F-M, et al. Cell surface heparan sulfates mediate internalization of the PWWP/HATH domain of HDGF via macropinocytosis to fine-tune cell signalling processes involved in fibroblast cell migration. *Biochem J* 2011;433:127–38.
- [254] Everett a D. Identification, cloning, and developmental expression of hepatoma-derived growth factor in the developing rat heart. *Dev Dyn* 2001;222:450–8.
- [255] Everett a D, Lobe DR, Matsumura ME, Nakamura H, McNamara C a. Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *J Clin Invest* 2000;105:567–75.
- [256] Hutten S, Flotho A, Melchior F, Kehlenbach RH. The Nup358-RanGAP complex is required for efficient importin alpha/beta-dependent nuclear import. *Mol Biol Cell* 2008;19:2300–10.

- [257] Gerard B, Tait L, Nangia-Makker P, Shekhar MP. Rad6B acts downstream of Wnt signaling to stabilize β -catenin: Implications for a novel Wnt/ β -catenin target. *J Mol Signal* 2011;6:6.
- [258] Cortés R, Roselló-Lletí E, Rivera M, Martínez-Dolz L, Salvador A, Azorín I, et al. Influence of heart failure on nucleocytoplasmic transport in human cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2010;85:464–72.
- [259] Posch M, Khoudoli G a, Swift S, King EM, Deluca JG, Swedlow JR. Sds22 regulates aurora B activity and microtubule-kinetochore interactions at mitosis. *J Cell Biol* 2010;191:61–74.
- [260] Jiang Y, Scott K, Kwak S, Chen R, Mardon G. Sds22/PP1 links epithelial integrity and tumor suppression via regulation of myosin II and JNK signaling. *Oncogene* 2011;30:3248–60.
- [261] Hata Y, Duh E, Zhang K, Robinson GS, Aiello LP. Transcription Factors Sp1 and Sp3 Alter Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression through a Novel Recognition Sequence. *J Biol Chem* 1998;273:19294–303.
- [262] Liu W, Innocenti F, Wu M, Desai A. A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Res* 2005;65:46–53.
- [263] Carpentier C, Laigle-Donadey F, Marie Y, Auger N, Benouaich-Amiel a, Lejeune J, et al. Polymorphism in Sp1 recognition site of the EGF receptor gene promoter and risk of glioblastoma. *Neurology* 2006;67:872–4.
- [264] Guo H, Xing Y, Liu R, Chen S, Bian X, Wang F, et al. -216G/T (rs712829), a functional variant of the EGFR promoter, is associated with the pleural metastasis of lung adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2013;6:693–8.
- [265] McKibbin T, Zhao W, Tagen M. Epidermal growth factor receptor polymorphisms and risk for toxicity in paediatric patients treated with gefitinib. *Eur J ...* 2010;46:2045–51.
- [266] Mok T, Wu Y. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *New Engl J Med J ...* 2009;361:947–57.
- [267] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121–8.
- [268] Gridelli C, De Marinis F, Di Maio M, Cortinovis D, Cappuzzo F, Mok T. Gefitinib as first-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer with activating epidermal growth factor receptor mutation: Review of the evidence. *Lung Cancer* 2011;71:249–57.
- [269] Heist R, Christiani D. EGFR-targeted therapies in lung cancer: predictors of response and toxicity. *Pharmacogenomics* 2009;10:59–68.
- [270] Perlini S, Chang E. Atrial fibrillation and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Tech* 2013;3–28.
- [271] Swedberg K, Zannad F, McMurray JJ V, Krum H, van Veldhuisen DJ, Shi H, et al. Eplerenone and atrial fibrillation in mild systolic heart failure: results from the EMPHASIS-HF (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure) study. *J Am Coll Cardiol* 2012;59:1598–603.
- [272] Alpert JS, Petersen P, Godtfredsen J. Atrial fibrillation: natural history, complications, and management. *Annu Rev Med* 1988;39:41–52.
- [273] Van Wagoner DR. Basic mechanisms of atrial fibrillation. *Cleve Clin J Med* 2003;70:2–5.
- [274] Allesie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;54:230–46.
- [275] Nattel S. Atrial electrophysiology and mechanisms of atrial fibrillation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003;8 Suppl 1:S5–11.
- [276] Mayyas F, Alzoubi KH, Van Wagoner DR. Impact of aldosterone antagonists on the substrate for atrial fibrillation: aldosterone promotes oxidative stress and atrial structural/electrical remodeling. *Int J Cardiol* 2013;168:5135–42.
- [277] Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:802–9.
- [278] Lavall D, Selzer C, Schuster P, Lenski M, Adam O, Schäfers H-J, et al. The mineralocorticoid receptor promotes fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *J Biol Chem* 2014;289:6656–68.

- [279] Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of Atrial Fibrillation by Heart Failure in Dogs : Atrial Remodeling of a Different Sort. *Circulation* 1999;100:87–95.
- [280] Reil J-C, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, et al. Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2012;33:2098–108.
- [281] Sanders P, Morton JB, Davidson NC, Spence SJ, Vohra JK, Sparks PB, et al. Electrical remodeling of the atria in congestive heart failure: electrophysiological and electroanatomic mapping in humans. *Circulation* 2003;108:1461–8.
- [282] Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954–68.
- [283] Werner CM, Böhm M. The therapeutic role of RAS blockade in chronic heart failure. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008;2:167–77.
- [284] Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K, Mano T, Sakata Y, Nishio M, et al. Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R946–54.
- [285] Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2004;5 Suppl 1:S7–10.
- [286] Tsai C-T, Chiang F-T, Tseng C-D, Hwang J-J, Kuo K-T, Wu C-K, et al. Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:758–70.
- [287] Zhao J, Li J, Li W, Li Y, Shan H, Gong Y, et al. Effects of spironolactone on atrial structural remodelling in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged atrial pacing. *Br J Pharmacol* 2010;159:1584–94.
- [288] Lendeckel U, Dobrev D, Goette A. Aldosterone-receptor antagonism as a potential therapeutic option for atrial fibrillation. *Br J Pharmacol* 2010;159:1581–3.
- [289] Weber KT. Aldosterone and spironolactone in heart failure. *N Engl J Med* 1999;341:753–5.
- [290] Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, Leenhardt A, Vicaut E, Robidel E, et al. Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J* 2005;26:2193–9.
- [291] Sun Y, Ramires FJ, Weber KT. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res* 1997;35:138–47.
- [292] Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res* 1990;67:1355–64.
- [293] De-An P, Li L, Zhi-Yun X, Jin-Yu H, Zheng-Ming X, Min W, et al. Increased expression of mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human atria during atrial fibrillation. *Clin Cardiol* 2010;33:23–9.
- [294] Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, et al. Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition on the Development of the Atrial Fibrillation Substrate in Dogs With Ventricular Tachypacing-Induced Congestive Heart Failure. *Circulation* 2001;104:2608–14.
- [295] Kumagai K, Nakashima H, Urata H, Gondo N, Arakawa K, Saku K. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2197–204.
- [296] Shroff SC, Ryu K, Martovitz NL, Hoit BD, Stambler BS. Selective aldosterone blockade suppresses atrial tachyarrhythmias in heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2006;17:534–41.
- [297] Perlini S, Salinaro F, Fonte ML. Direct renin inhibition: another weapon to modulate the renin-angiotensin system in postinfarction remodeling? *Hypertension* 2008;52:1019–21.
- [298] Dabrowski R, Borowiec A, Smolis-Bak E, Kowalik I, Sosnowski C, Kraska A, et al. Effect of combined spironolactone- β -blocker \pm enalapril treatment on occurrence of symptomatic atrial fibrillation episodes in patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation (SPIR-AF study). *Am J Cardiol* 2010;106:1609–14.
- [299] Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2004;63:423–32.
- [300] Kléber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev* 2004;84:431–88.

- [301] Klugbauer N, Specht V, Welling A. Spannungsabhängige Kalziumkanäle: Neue Einblicke mit Hilfe transgener Mausmodelle. *BIOspektrum* 2002;6:704–7.
- [302] Vassort G, Talavera K, Alvarez JL. Role of T-type Ca²⁺ channels in the heart. *Cell Calcium* 2006;40:205–20.
- [303] Niwa N, Yasui K, Opthof T, Takemura H, Shimizu A, Horiba M, et al. Cav 3.2 subunit underlies the functional T-type Ca²⁺ channel in murine hearts during the embryonic period. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2004;286:2257–63.
- [304] Qu Y, Boutjdir M. Gene expression of SERCA2a and L- and T-type Ca channels during human heart development. *Pediatr Res* 2001;50:569–74.
- [305] Cribbs LL, Lee J-H, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud a., et al. Cloning and Characterization of 1H From Human Heart, a Member of the T-Type Ca²⁺ Channel Gene Family. *Circ Res* 1998;83:103–9.
- [306] Monteil a. Molecular and Functional Properties of the Human alpha 1G Subunit That Forms T-type Calcium Channels. *J Biol Chem* 2000;275:6090–100.
- [307] Izumi T, Kihara Y, Sarai N, Yoneda T, Iwanaga Y, Inagaki K, et al. Reinduction of T-type calcium channels by endothelin-1 in failing hearts in vivo and in adult rat ventricular myocytes in vitro. *Circulation* 2003;108:2530–5.
- [308] Mairleth M, Gd. P. of T -type Ca²⁺ Channels in Ventricular Cells from Hypertrophied Rat Hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:1617–25.
- [309] Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;83:117–61.
- [310] Iftinca M. Neuronal T-type calcium channels : What's new ? *J Med Life* 2011;4:126–38.
- [311] Marger L, Mesirca P, Alig J, Torrente A, Dubel S, Engeland B, et al. Functional roles of Cav1.3, Cav3.1 and HCN channels in automaticity of mouse atrioventricular cells: Insights into the atrioventricular pacemaker mechanism. *Channels* 2011;5:251–61.
- [312] Mangoni ME, Couette B, Marger L, Bourinet E, Striessnig J, Nargeot J. Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:38–63.
- [313] Le Quang K, Naud P, Qi X-Y, Duval F, Shi Y-F, Gillis M-A, et al. Role of T-type calcium channel subunits in post-myocardial infarction remodelling probed with genetically engineered mice. *Cardiovasc Res* 2011;91:420–8.
- [314] Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni A, Couette B, Marger L, Le Quang K, et al. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res* 2006;98:1422–30.
- [315] Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, et al. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007;115:442–9.
- [316] Barrett CF, Tsien RW. The Timothy syndrome mutation differentially affects voltage- and calcium-dependent inactivation of CaV1.2 L-type calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2157–62.
- [317] Catterall W a. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a003947.
- [318] Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:62–73.
- [319] Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hala O, Doerfel C, et al. Molecular Basis of Downregulation of G-Protein-Coupled Inward Rectifying K⁺ Current (I_{K,ACh}) in Chronic Human Atrial Fibrillation: Decrease in GIRK4 mRNA Correlates With Reduced I_{K,ACh} and Muscarinic Receptor-Mediated Shortening of Action Potentials. *Circulation* 2001;104:2551–7.
- [320] Dobrev D, Friedrich a, Voigt N, Jost N, Wettwer E, Christ T, et al. The G protein-gated potassium current I_(K,ACh) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005;112:3697–706.
- [321] Carnes C a, Janssen PML, Ruehr ML, Nakayama H, Nakayama T, Haase H, et al. Atrial glutathione content, calcium current, and contractility. *J Biol Chem* 2007;282:28063–73.
- [322] Burashnikov A, Antzelevitch C. Reinduction of atrial fibrillation immediately after termination of the arrhythmia is mediated by late phase 3 early afterdepolarization-induced triggered activity. *Circulation* 2003;107:2355–60.

- [323] De Mello WC. Intracellular and extracellular renin have opposite effects on the regulation of heart cell volume. Implications for myocardial ischaemia. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2008;9:112–8.
- [324] Chen Y-J, Chen Y-C, Tai C-T, Yeh H-I, Lin C-I, Chen S-A. Angiotensin II and angiotensin II receptor blocker modulate the arrhythmogenic activity of pulmonary veins. *Br J Pharmacol* 2006;147:12–22.
- [325] Fareh S, Bénardeau a, Nattel S. Differential efficacy of L- and T-type calcium channel blockers in preventing tachycardia-induced atrial remodeling in dogs. *Cardiovasc Res* 2001;49:762–70.
- [326] Chai S, Li M, Lan J, Xiong Z-G, Saugstad J a, Simon RP. A kinase-anchoring protein 150 and calcineurin are involved in regulation of acid-sensing ion channels ASIC1a and ASIC2a. *J Biol Chem* 2007;282:22668–77.
- [327] Koch SE, Gao X, Haar L, Jiang M, Lasko VM, Robbins N, et al. Probenecid: novel use as a non-injurious positive inotrope acting via cardiac TRPV2 stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 2012;53:134–44.
- [328] Yamamoto-Mizuma S, Wang G-X, Liu LL, Schegg K, Hatton WJ, Duan D, et al. Altered properties of volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs) and membrane protein expression in cardiac and smooth muscle myocytes from *Clcn3*^{-/-} mice. *J Physiol* 2004;557:439–56.
- [329] Duan D, Liu LLH, Bozeat N, Huang ZM, Xiang SY, Wang G, et al. Functional role of anion channels in cardiac diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:265–78.
- [330] Baumgarten CM, Clemo HF. Swelling-activated chloride channels in cardiac physiology and pathophysiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;82:25–42.
- [331] Duan D. Phenomics of cardiac chloride channels: the systematic study of chloride channel function in the heart. *J Physiol* 2009;587:2163–77.
- [332] Grieve DJ, Byrne J a, Siva A, Layland J, Johar S, Cave AC, et al. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:817–26.
- [333] Carnes C a., Chung MK, Nakayama T, Nakayama H, Baliga RS, Piao S, et al. Ascorbate Attenuates Atrial Pacing-Induced Peroxynitrite Formation and Electrical Remodeling and Decreases the Incidence of Postoperative Atrial Fibrillation. *Circ Res* 2001;89:e32–8.
- [334] Adam O, Frost G, Custodis F, Sussman M a, Schäfers H-J, Böhm M, et al. Role of Rac1 GTPase activation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:359–67.
- [335] Hirschberg B, Maylie J, Adelman JP, Marrion N V. Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K⁺ channels by calcium. *J Gen Physiol* 1998;111:565–81.
- [336] Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, Xu D, Zhang Y, Rodriguez J, et al. Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K⁺ channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem* 2003;278:49085–94.
- [337] Li N, Timofeyev V, Tuteja D, Xu D, Lu L, Zhang Q, et al. Ablation of a Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. *J Physiol* 2009;587:1087–100.
- [338] Yu T, Deng C, Wu R, Guo H, Zheng S, Yu X, et al. Decreased expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1 and SK2 in human chronic atrial fibrillation. *Life Sci* 2012;90:219–27.
- [339] Kye M-J, Spiess J, Blank T. Transcriptional regulation of intronic calcium-activated potassium channel SK2 promoters by nuclear factor-kappa B and glucocorticoids. *Mol Cell Biochem* 2007;300:9–17.
- [340] Du J, Xie J, Zhang Z, Tsujikawa H. TRPM7-mediated Ca²⁺ signals confer fibrogenesis in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2010;106:992–1003.
- [341] Zhang Y-H, Sun H-Y, Chen K-H, Du X-L, Liu B, Cheng L-C, et al. Evidence for functional expression of TRPM7 channels in human atrial myocytes. *Basic Res Cardiol* 2012;107:282.
- [342] Miquel P. Regulation of TRPM7 by Aldosterone. McGill University Montreal, 2011.
- [343] Yogi A, Callera GE, O'Connor S, Antunes TT, Valinsky W, Miquel P, et al. Aldosterone signaling through transient receptor potential melastatin 7 cation channel (TRPM7) and its α -kinase domain. *Cell Signal* 2013;25:2163–75.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
Accn1	<i>Amiloride-Sensitive Cation Channel 1</i>
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AF	Aktivierungsfunktion
Ang	Angiotensin
AP-1	Aktivatorprotein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ATCH	Adenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchinonsäure
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BTC	Betacellulin
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
ca	circa
Ca ²⁺	Calciumionen
Cacna	<i>Calcium Channel Alpha Subunit</i>
CARLA	<i>Cardiovascular Disease, Living and Ageing in Halle</i>
CBP	CREB-Bindeprotein
Cdc42Hs	<i>Cell Division Control Protein 42 Homolog</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
c-fos	<i>Finkel-Biskis-Jenkins Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i>
Clnc	<i>Chloride Channel</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary Cells</i>
CMV	Cytomegavirus
CRE	cAMP-responsives Element

CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>
Crk	<i>v-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog</i>
c-Src	<i>Cytoplasmic v-src Avian Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
CST	<i>Cell Signaling Technology Buffer</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
CYP11B2	Aldosteronsynthase
DBD	DNA-Bindedomäne
ddct	<i>Delta-Delta-Cycle-Threshold</i>
DEG	Degenerin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOCA	Deoxycorticosteron
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
TF-ELISA	<i>Transcription Factor-Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Elk	<i>E26 Transformation-Specific -Like Gene</i>
ELL	<i>Eleven-Nineteen Lysine-rich Leukemia</i> , Elongationsfaktor
EMPHASIS-HF	<i>Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure</i>
EMSA	<i>Electromobility Shift Assay</i>
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
EPCR	Endothelialer Protein C-Rezeptor
EPHESUS	<i>Eplerenone Heart Failure Efficacy and Survival Study</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i> , Östrogenrezeptor
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
ET-1	Endothelin-1
ETS	<i>E26 transformation-specific</i> , Transkriptionsfaktor
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , fetales Kälberserum
G	Guanin
Gab1	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2 -Associated-Binding Protein</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
ggf	gegebenenfalls

GR	Glukokortikoidrezeptor
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRE	Glukokortikoid-responsives Element
GPR30/GPER	<i>G-Protein Coupled Progesteron Receptor</i>
GPR64	<i>G-protein coupled Receptor 64</i>
GST	<i>Glutathione S-Transferase</i>
H ⁺	Wasserstoffionen
HAoSMC	<i>Human Aortic Smooth Muscle Cells</i>
HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HEK	<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>
HeLa	Henrietta Lacks -Zellen
12-,15-HETE	12,- 15- Hydroxyeicosatetraensäure
HDGF	<i>Hepatoma-Derived Growth Factor</i>
HK2	<i>Human Kidney Cells</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HRE	Hormon-responsives Element
HRP	<i>Horse Radish Peroxydase</i>
11 β -HSD2	11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HSP70, HSP90	Hitzeschock-Protein 70 und 90
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JIK	<i>Inhibitory Kinase of c-Jun N-terminal / Stress-Activated Protein Kinases</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
K ⁺	Kaliumionen
kb	Kilobase
Kcn	<i>Potassium Voltage-Gated Channel</i>
kDa	Kilo-Dalton
ki-Ras-2a	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
LBD	Ligandenbindedomäne
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MCS	<i>Multi Cloning Site</i>
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MEK	MAPK/ERK-Kinase

MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MKP	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase</i>
MOPS	3-(N- Morpholino)-Propansulfonsäure
hMR/ MR	(humaner) Mineralokortikoidrezeptor
MRE	Mineralokortikoid-responsives Element
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert
N, n	Anzahl der unabhängigen Experimente, Anzahl der Replikate
NaCl	Natriumchlorid
NADP/ NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NcoR	<i>Nuclear Receptor Corepressor</i>
NDF	Neu-Differenzierungsfaktor
NE	Nukleäre Extrakte
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor of Activated B-Cells</i>
NHE1	<i>Sodium proton exchanger 1</i>
NLS	<i>Nuclear Localisation Sequence</i> , Kernlokalisierungssequenz
NO	<i>Nitric Oxyde</i> , Stickstoffmonoxid
NRG	Neuregulin
OK	<i>Opossum Kidney Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat
PKA, PKB, PKC, PKD	Proteinkinase A-D
PML	<i>Promyelocytic Leukemia Protein</i>
PPP1R7	<i>Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 7</i>
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PTB	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Rac	Rat Sarcoma-Related C3 Botulinum Toxin Substrate, G-Protein
Raf	<i>Rat Fibrosarcoma</i> , Kinase
RALES	<i>Randomized Aldactone Evaluation Study</i>
RanGAP1	<i>Ran GTPase-Activating Protein 1</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i> , G-Protein
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i> , rot-fluoreszierendes Protein
rhSP1, rhSP3	rekombinantes humanes SP1 bzw. SP3
RHA	RNA-Helikase A
RIPA	<i>Radio Immunoprecipitation Assay Buffer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RPTEC	<i>Primary Renal Proximal Tubule Epithelial Cells</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SAPK	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
Scn	<i>Sodium Channel</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEAP	<i>Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SH2	<i>Src-Homology 2</i> , <i>Steroid Receptor Coactivator-Homology 2</i>
Shc	<i>SH2-Containing Protein</i>
SHIP	<i>Study of Health in Pomerania</i>
SHRSP	<i>Spontaneously Hypertensive Stroke Prone</i>
siRNA	<i>Small interfering Ribonucleic Acid</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor</i>
Sos	<i>Son of Sevenless</i> , Nukleotidaustauschfaktor
SP1, SP2, SP3, SP4	<i>Specificity Protein 1-4</i>
SP1/SP3cons	SP1-/ SP3-Konsensussequenz
SPTBN1	<i>Spectrin Beta, Non-Erythrocytic 1</i>
SRC	<i>Steroid Receptor Coactivator</i>
ST3Gal2	<i>ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 2</i>
StAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>

STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
T	Thymin
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamin-Tetraessigsäure
TARDBP	<i>TAR DNA-Binding Protein</i>
TBE	TRIS-Borat- Ethylendiamin-Tetraessigsäure
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline mit Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha
Trpc, Trpm, Trpv	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C, M, V</i>
Tsg101	<i>Tumor Suppressor Gene 101</i>
u.a.	unter anderem
Ubc	<i>Ubiquitin C</i>
UBE2B	<i>Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2B</i>
UTR	Untranslatierte Region
VIL2	Villin 2
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> , glatte Gefäßmuskelzellen
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
z.B	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Charakteristische Protein-Domänen von Nukleären Rezeptoren am Beispiel des MR.	7
Abb. 2: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.....	12
Abb. 3: Schematische Darstellung des EGFR.....	16
Abb. 4: Schematische Darstellung der ErbB-Rezeptorfamilie und ihrer jeweiligen Liganden und Dimerisierungspartner.....	18
Abb. 5: Schematische Darstellung ausgewählter EGFR-Signalkaskaden.....	20
Abb. 6: Schematische Darstellung des Zusammenwirkens von MR und EGFR sowie der Transaktivierung des EGFR über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	25
Abb. 7: Zusammenfassung der Zielsetzungen.....	27
Abb. 8: Eingrenzung des Mineralokortikoid-responsiven Elements auf dem EGFR-Promotor.....	48
Abb. 9: MR-Bindung an MRE1.....	49
Abb. 10: Bindung von rhSP1 an MRE1.3.....	50
Abb. 11: Bindung von rhSP1 an verschiedene biotinylierte Sonden.....	51
Abb. 12: Bindung von MRE1.3, MRE1.3mut1 und MRE1.3mut2 an SP1 aus nukleären Extrakten.....	52
Abb. 13: Analysen zur Relevanz der SP1-Bindestelle für die Aldosteron-induzierte Aktivierung des EGFR-Promotors.....	54
Abb. 14: Bedeutung des Transkriptionsfaktors SP1 für die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung.....	55
Abb. 15: SP1- <i>Knock-down</i> mittels spezifischer siRNA in HEK293-Zellen.....	59
Abb. 16: SP1- <i>Knock-down</i> mittels spezifischer siRNA in HEK293-Zellen hemmt die Aldosteron-induzierte EGFR-Promotoraktivierung.....	60
Abb. 17: Bindung von rekombinantem humanen SP3 an biotinylierte SP1cons- und MRE1.3-Sonde.....	61
Abb. 18: SP3- <i>Knock-down</i> in HEK293-Zellen mittels spezifischer siRNA.....	62
Abb. 19: Einfluss des Transkriptionsfaktors SP3 auf die MR/Aldosteron-induzierte MRE1.3-Aktivierung.....	63
Abb. 20: Einfluss der SP1-Hemmung auf die EGFR-Expression in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen.....	65
Abb. 21: Lokalisierung von RFP-MR und EGFP-SP1 in HEK293-Zellen.....	67
Abb. 22: Validierung putativer MR-regulierter Kandidatengene mittels qPCR-Analysen.....	70
Abb. 23: Bindung von MRE1.3, MRE1.3-SNP1 sowie -SNP(2) an rhSP1.....	72
Abb. 24: Bindung von MRE1.3, MRE1.3-SNP1 sowie MRE1.3-SNP2 an SP1 aus nukleären Extrakten.....	73
Abb. 25: Aldosteron-induzierte Aktivierbarkeit der verschiedenen MRE1.3-Promotorelemente in HEK293-Zellen.....	75
Abb. 26: Aldosteron-induzierte Reaktivierbarkeit der verschiedenen MRE1.3-Promotorelemente in OK-Zellen.....	76
Abb. 27: SP1 als bedeutender Kofaktor der Aldosteron-induzierten EGFR-Promotoraktivierung.....	77
Abb. 28: Expression verschiedener Ionenkanäle des Herzens in EGFR-KO-Mäusen im Vergleich zu EGFR-KO-Mäusen.....	81
Abb. 29: Validierung der Ionenkanäle mittels qPCR in Herzgewebe.....	83
Abb. 30: Validierung der Ionenkanäle in Kardiomyozyten.....	84
Abb. 31: Einfluss von Aldosteron auf das Expressionsmuster der Ionenkanäle in EGFR-WT- und EGFR-KO-Tieren.....	86
Abb. 32: Mögliche Modelle der MR-SP1-MRE1.3-Interaktion.....	91
Abb. 33: Elektrokardiogramm bei Sinusrhythmus und Vorhofflimmern.....	101
Abb. 34: Schema eines T-Typ-Calciumkanals.....	106

9. Anhang

A) Material/Methoden:

A1) Primer

A1.1) Validierung der Kandidatengene mit MRE-ähnlichen Promotorelementen

Gen (human)	Primer	Oligo (5'-3')	Reaktionsbedingungen
ST3Gal2	ST3Gal2 sense	5'ACGTCCAGAGGTGGTGGATG3'	58° C Annealing, Produkt: 214 bp
	ST3Gal2 anti	5'CTCATGATGAAGTTGTGCCCGT3'	
TARDBP	TARDBP sense	5'TGTATGTTGTCAACTATCCAAAAG3'	58°C Annealing, Produkt: 188 bp
	TARDBP anti	5'CTGCACCATAAGAACTTCTCCA3'	
HDGF	HDGF sense	5'CCAAGGAGAAGTTTGGCAAG3'	54°C Annealing, Produkt: 259 bp
	HDGF anti	5'TTCAACGCTCCTTTCTCGTT3'	
RNase K	RNase K sense	5'AATGTCCATTCCGCTGTGTT3'	56°C Annealing, Produkt: 196 bp
	RNase K anti	5'AGCGCACCATGTATTCCTTG3'	
Netrin-4	NTN4 sense	5'CCAGTCCTTTTCCATGCACT3'	56°C Annealing, Produkt: 112 bp
	NTN4 anti	5'GCTGCCCTTGACAATGAAAT3'	
SPTBN1	SPTBN1 sense	5'CCCAGACAAAGGCCAGCGG3'	64°C Annealing, Produkt: 283 bp
	SPTBN1 anti	5'ACGGTGAGGCGCTTGCTGTC3'	
PPP1R7	PPP1R7 sense	5'CACGATGTTGGACATTGCAT3'	55°C Annealing, Produkt: 109 bp
	PPP1R7 anti	5'GCTCCAGCTCTCAAGGAGATT3'	
LMNB1	LMNB1 sense	5'CAATGACCGGCTGGCGGTGT3'	54°C Annealing, Produkt: 237 bp
	LMNB1 anti	5'AGCAGCTGGTCGTGTTCCGC3'	
UBE2B	UBE2B sense	5'TCCAAAATGTTTCATCCAAAT G3'	58°C Annealing, Produkt: 132 bp
	UBE2B anti	5'ATTCGGTTCATCCAGCAGAG3'	
GPR64	GPR64 sense	5'ACCAGCGCACCTCCTGTCCA3'	58°C Annealing, Produkt: 189 bp
	GPR64 anti	5'TTG AGC CAG AGG GGC CAG CA3'	
RanGAP1	RanGAP1 sense	5'GGCCTTAGAGAAGAAGTCGGA3'	66°C Annealing, Produkt: 148 bp
	RanGAP1 anti	5'GCTTAAGTCCAGCTCCACCA3'	
SLC24A4	SLC24A4 sense	5'TGCCGAGACTCCGTGTAATA3'	60°C Annealing, Produkt: 305 bp
	SLC24A4 anti	5'ACGGGGTTCCTTGCCATACTG3'	

A1.2) Validierung EGFR-abhängiger Ionenkanäle

Gen (Maus)	Primer	Oligo (5'-3')	Reaktionsbedingungen
Asic2	Asic2 sense	5'GAGTGCCGATCCTCAGAGA3'	56°C Annealing, Produkt: 248 bp
	Asic2 anti	5'TGTAGCGGGTTAGGTTGCAG3'	
Cacna1c	Cacna1c sense	5'CCTGCTGGTGGTTAGCGTG3'	60°C Annealing, Produkt: 285 bp
	Cacna1c anti	5'TCTGCCTCCGTCTGTTTAGAA3'	
Cacna1g	Cacna1g sense	5'TGTCTCCGCACGGTCTGTAA3'	60°C Annealing, Produkt: 205 bp
	Cacna1g anti	5'AGATACCCAAAGCGACCATCTT3'	
Cacna1h	Cacna1h sense	5'CGTGACACTGGGCATGTTC3'	56°C Annealing, Produkt: 229 bp
	Cacna1h anti	5'TCCGTCCAGAGAGTATTCCATC3'	
Cacna1i	Cacna1i sense	5'GGGCGTGGCCTGTTTAGTC3'	62°C Annealing, Produkt: 172 bp
	Cacna1i anti	5'TGAGGGTCTCGGAGTGCTC3'	
Trpm1	Trpm1 sense	5'CTGGGGCATGGTGGAGAAC3'	53°C Annealing, Produkt: 114 bp
	Trpm1 anti	5'TGAGTGTGGGAATTGTTGAGC3'	
Trpm8	Trpm8 sense	5'ACAGACGTGTCCTACAGTGAC3'	55°C Annealing, Produkt: 132 bp
	Trpm8 anti	5'GCTCTGGGCATAACCACACTT3'	
Trpv2	Trpv2 sense	5'TGCTGAGGTGAACAAAGGAAAG3'	62°C Annealing, Produkt: 147 bp
	Trpv2 anti	5'TCAAACCGATTTGGGTCCTGT3'	
Trpv4	Trpv4 sense	5'CCTTGTTGACTACGGCACTT3'	64 °C Annealing, Produkt: 144 bp
	Trpv4 anti	5'GGATGGGCCGATTGAAGACTT3'	
Kcnq3	Kcnq3 sense	5'CAAGTACAGGCGCATCCAAAC3'	51°C Annealing, Produkt: 115 bp
	Kcnq3 anti	5'GGCCAGAATCAAGCATCCCA3'	
Scn8a	Scn8a sense	5'ACCCGTAATTTGACGCAGA3'	60°C Annealing, Produkt: 222 bp
	Scn8a anti	5'TGGACCATTCCGGAGGGTTA3'	
Kcnn2	Kcnn2 sense	5'ACCACGCCAGGGAAATACAG3'	56°C Annealing, Produkt: 156 bp
	Kcnn2 anti	5'GGGCTGTCCATGTGAACGTA3'	
Clnc3	Clnc3 sense	5'ACTCATACAACCCTGGCTGC3'	56°C Annealing,

	Clnc3 anti	5'CTGTGCAAAACACACCCGAG3'	Produkt: 264 bp
Clnc7	Clnc7 sense	5'CTTCGTA CTCTCGTGGGGTCTG3'	60°C Annealing, Produkt: 324 bp
	Clnc7 anti	5'GCTCCAGCTGAGACAAAATCC3'	
Referenzgen	Primer	Oligo (5'-3')	Reaktionsbedingungen
18 S (human, Maus)	18S sense	5'CTCAACACGGGAAACCTCAC3'	56°C Annealing, Produkt: 268 bp
	18S anti	5'CGGACATCTAAGGGCATCAC3'	

A1.3) Oligohybridisierung

DNA-Sonde	Primer	Oligo (5'-3')
MRE1.3mut1	MRE1.3mut1- sense	5' Bio- GCAGCAGCCCCTTCAACCGCACGGTGTGAGC GCCCGCCGCGGCCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAG
	MRE1.3mut1- anti	5' Bio- CTCGGGACTCCGGCCGCCTCGGCCGCGGCG GGCGCTCACACCGTGCGGTTGAAGGAGGCTGCTGC
MRE1.3mut2	MRE1.3mut2 - sense	5' Bio- GCAGCAGCCTCCTCTCCTCGCACGGTGTGAG CGCCCGCCGCGGCCGAGGCGGCCGGAGTCCCGAG
	MRE1.3mut2 - anti	5' Bio- CTCGGGACTCCGGCCGCCTCGGCCGCGGCG GGCGCTCACACCGTGCGAGGAGAGGAGGCTGCTGC
SP1cons	SP1cons - sense	5' Bio- ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC
	SP1cons - anti	5' Bio- GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT

A1.4) Biotin-PCR

DNA-Sonde	Primer	Oligo (5'-3')	DNA-Template	Anlagerungs-temperatur
CRE	CRE sense	5'Bio-GCACCAGACAGTGACGTCAG CTGCCAGAT	pSEAP- CRE	58°C
	CRE anti 65bp	5'Bio-GGTGTCTGAAAGACGTACACAG		55°C
	CRE anti 25bp	5'Bio-ATCTGGCAGCTGACGTCACTG TCTGGTGC		
MRE1.3	MRE1.3 sense	5'Bio-GGTACCGCAGCAGCCTCCTCC	pSEAP- MRE1.1	56°C
	MRE1.3 anti	5' Bio-CTCGGGACTCCGGCCGCCTCG GCCGCGGCGGGCGCTCACACCGTG CGGGG		
MRE1.3 SNP1	MRE1.3-G sense	5'Bio-GCAGCAGCCTCCGCCCCCGC ACGG	pSEAP- MRE1.1	55°C
	MRE1.3-A anti	5'Bio-CTCGGGACTCCGGCCGCCTCG GCCGCGT		
MRE1.3 SNP2	MRE1.3-G sense	5'Bio-GCAGCAGCCTCCGCCCCCGC ACGG	pSEAP- MRE1.1	55°C
	MRE1.3-G- anti	5'Bio-CTCGGGACTCCGGCCGCCTCG GCCGCGG		
MRE1.3a	MRE1.3a sense	5'Bio-GCAGCAGCCTCCTCCCC CGC ACGG	pSEAP- MRE1.3	57°C
	MRE1.3a anti	5'Bio-CCGTGCGGGGGGAGGAGG CT GCTGC		
MRE1.3c	MRE1.3c sense	5'Bio-TGTGAGCGCCCGCCGCGGCCG AGGCGGCCGGAGTCCCGAG	pSEAP- MRE1.3	57°C
	MRE1.3c anti	5'Bio-CTCGGGACTCCGGCCGCCTCG GCCGCGGCGGGCGCTCACA		
AP-1	AP-1sense	5'Bio-TGAGTCAGTGAGTCACTGACT CAC	pSEAP- AP-1	55°C
	AP-1 anti	5'Bio-GTGAGTCAGTGACTCACTGAC TCA		
NFkB	NFkB sense	5'Bio-GGGAATTTCCGGGAATTT CC	pSEAP- NFkB	55°C
	NFkB anti	5'Bio-GGAAATTTCCCGGAAATTTCC		

A1.5) Klonierungen

Gen	Primer	Oligo (5'-3')	Restriktions-schnittstellen
MRE1.3d	MRE1.3-(35) sense	5'TTGGATCCGCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGG TGTGAGCGCC3'	BamH1
	MRE1.3-(35) anti	5'AAGAATTCGGCGCTCACACCGTGCGGGGGGAG GAGGCTGCTGC3'	EcoRI
MRE1.3e	MRE1.3-(35) sense	5'TTGGATCCGCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGG TGTGAGCGCC3'	BamH1
	MRE1.3-(45) anti	5'GAATTCGGCCGCGCGGGCGCTCACA3'	EcoRI
MRE1.3f	MRE1.3-(35) sense	5'TTGGATCCGCAGCAGCCTCCTCCCCCGCACGG TGTGAGCGCC3'	BamH1
	MRE1.3-(55) anti	5'GAATTCGGCCGCGCCTCGGCCGCG3'	EcoRI

A1.6) Oligonukleotide für Klonierungen

Gen	Primer	Oligo (5'- 3')	Restriktions-schnittstellen
MRE1.3 mut Δ	MRE1.3mut Δ sense	5'TTGTTGGATCCGCAGCAGCCTCCTCCCCCGCA CGGGAGTCCCGAGGAATTCAGACAA3'	BamH1/EcoRI
	MRE1.3mut Δ anti	5'TTGTCTGAATTCCTCGGGACTCCCGTGCGGGGG GAGGAGGCTGCTGCGGATCCAACAA 3'	
MRE1.3 mut1	MRE1.3mut1 sense	5'TTGTCTGAATTCCTCGGGACTCCGGCCGCCTCG GCCGCGGCGGGCGCTCACACCGTGCGGTTGAAG GAGGCTGCTGCGGATCCAACAA3'	BamH1/EcoRI
	MRE1.3mut1 anti	5'TTGTCTGAATTCCTCGGGACTCCGGCCGCCTCG GCCGCGGCGGGCGCTCACACCGTGCGGTTGAAG GAGGCTGCTGCGGATCCAACAA3'	
MRE1.3 mut2	MRE1.3mut2 sense	5'TTGTTGGATCGCAGCAGCCTCCTCCTCGCAC GGTGTGAGCGCCCGCCGCGGCCGAGGCGGCCG GAGTCCCGAGGAATTCAGACAA3'	BamH1/EcoRI
	MRE1.3mut2 anti	5'TTGTCTGAATTCCTCGGGACTCCGGCCGCCTCG GCCGCGGCGGGCGCTCACACCGTGCGAGGAGAG GAGGCTGCTGCGGATCCAACAA3'	

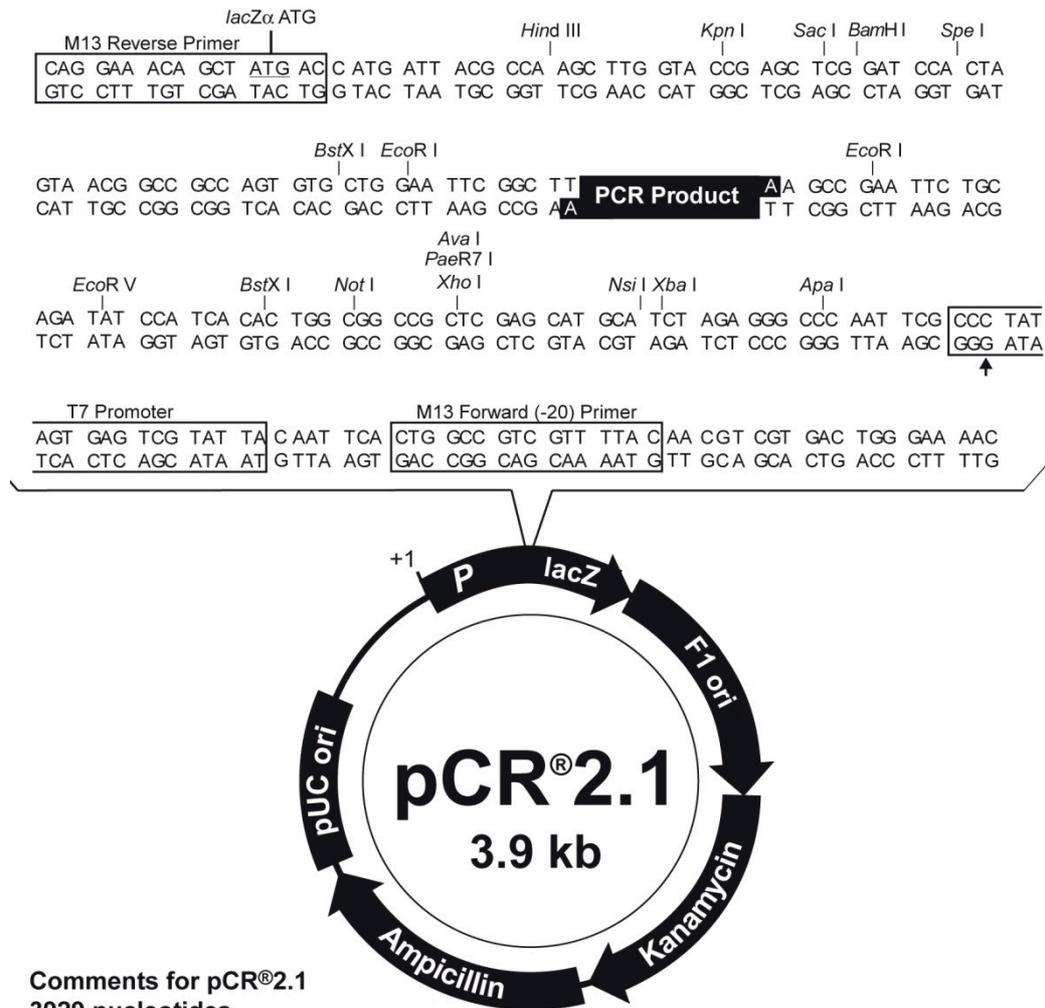
A2) Vektoren/Plasmide

A2.1) Sequenzen

Vektor	Sequenz unter
pCR2.1	http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcr2_1_seq.txt
pSEAP2-Basic	http://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/4070/
pEGFP-C1	http://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2487/
pCDNA™ 3.1- His A, His B His C	http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcdna3_1hisa_seq.txt http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcdna3_1hisb_seq.txt http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/vectors/pcdna3_1hisc_seq.txt

A2.2) Vektorkarten

siehe folgende Seiten



Comments for pCR®2.1
3929 nucleotides

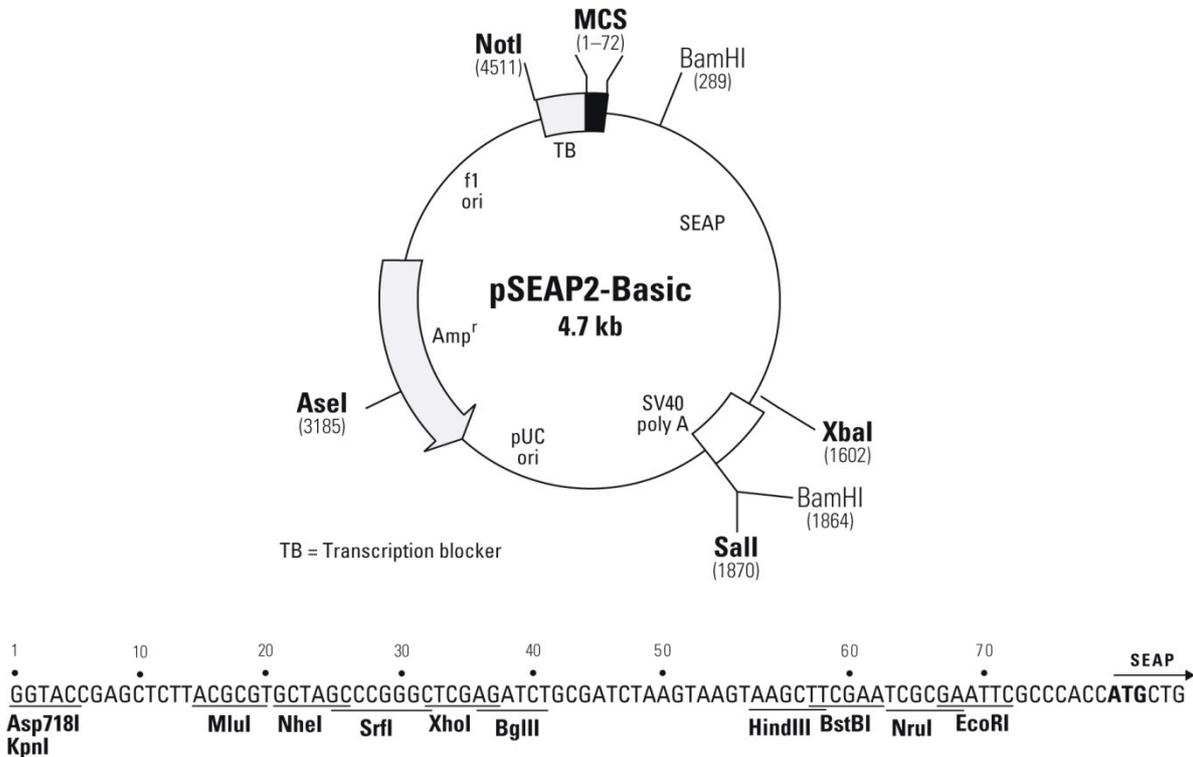
LacZ α gene: bases 1-545
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 T7 promoter: bases 362-381
 M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
 f1 origin: bases 546-983
 Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
 Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
 pUC origin: bases 3134-3807

pSEAP2-Basic Vector Information

PT3075-5

GenBank Accession #: U89937

Cat. Nos. 631715 & 631735



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pSEAP2-Basic. Unique restriction sites are in bold.

Description:

pSEAP2-Basic allows for expression of the reporter gene secreted alkaline phosphatase (SEAP). This vector lacks eukaryotic promoter and enhancer sequences and has an MCS that allows putative promoter DNA fragments to be inserted upstream of the SEAP gene. Enhancers can be cloned into either the MCS or unique downstream sites. The SEAP coding sequence is followed by the SV40 late polyadenylation signal to ensure proper, efficient processing of the SEAP transcript in eukaryotic cells. A synthetic transcription blocker (TB), composed of adjacent polyadenylation and transcription pause sites, located upstream of the MCS reduces background transcription (1). The vector backbone also contains an f1 origin for single-stranded DNA production, a pUC origin of replication, and an ampicillin resistance gene for propagation and selection in *E. coli*. The SEAP2 Vectors incorporate a number of features that improve the sensitivity of SEAP by increasing the efficiency of SEAP expression or that enhance the utility of the vectors. These include: an improved Kozak consensus translation initiation site (2); the removal of the SV40 small-t intron, which can cause cryptic splicing and reduced expression in some genes and/or cell types (3, 4); switching from the early to late polyadenylation signal of SV40, which typically causes a five-fold increase in mRNA levels (5); an expanded multiple cloning site (MCS); compact plasmid size; and removal of extraneous sequences from the 3' untranslated region of the SEAP mRNA.

Use:

The integrated set of Great EscAPe™ SEAP2 Vectors has been designed to provide maximal flexibility in studying regulatory sequences from the gene of interest. pSEAP2-Basic allows for expression of SEAP under control of putative promoters and/or enhancers of interest. The secreted SEAP enzyme is assayed directly from the culture medium and permits time-course studies not possible with assays dependent on cell lysates. Furthermore, the cells can be used for further investigations such as RNA or protein studies. The SEAP2 Vectors can be transfected into mammalian cells by any standard method.

Location of features:

- Multiple Cloning Site: 1–72
- Secreted alkaline phosphate (SEAP) gene:
 - Kozak consensus translation initiation signal: 75–82
 - SEAP coding sequences:
 - Start codon (ATG): 80–82
 - Stop codon: 1637–1639
 - Signal peptide: 80–130
 - Mature protein: 131–1636
 - C-terminal extension to SEAP: 1598–1636
- SV40 Late mRNA polyadenylation signal: 1750–1755
mRNA 3' end: 1769
- pUC plasmid replication origin: 2148–2791
- Ampicillin resistance gene:
 - Promoter: –35 region: 3869–3864; –10 region: 3846–3841
 - Transcription start point: 3834
 - Ribosome binding site: 3811–3807
 - β-lactamase coding sequences:
 - start codon (ATG): 3799–3797; stop codon: 2941–2939
 - β-lactamase signal peptide: 3799–3731
 - β-lactamase mature protein: 3730–2942
- f1 single-strand DNA origin (packages the coding strand of SEAP): 3931–4386
- Transcription blocker (TB): 4517–4670
 - Synthetic polyadenylation site (6): 4517–4565
 - Transcription pause site from human α2 globin gene (7): 4579–4670

Recommended sequencing primers:

5' of MCS: 4619–4638 (5'-CTAGCAAATAGGCTGTCCC-3')

3' of MCS: 185–165 (5'-CCTCGGCTGCCTCGCGTTCC-3')

Propagation in *E. coli*

- Suitable host strains: DH5α and other general purpose strains. Single-stranded DNA production requires a host containing an F' episome such as JM109.
- Selectable marker: plasmid confers resistance to ampicillin (100 µg/ml) to *E. coli* hosts.
- *E. coli* replication origin: pUC
- Copy number: ~500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/Col E1

References:

1. Eggermont, J. & Proudfoot, N. (1993) *EMBO J.* **12**:2539–2548.
2. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**:8125–8148.
3. Huang, M. T. F. & Gorman, C. M. (1990) *Mol. Cell. Biol.* **10**:1805–1810.
4. Evans, M. J. & Scarpulla, R. C. (1989) *Gene* **84**:135–142.
5. Carswell, S. & Alwine, J. C. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**:4248–4258.
6. Levitt, N. *et al.* (1989) *Genes Dev.* **3**:1019–1025.
7. Enriquez-Harris, P. *et al.* (1991) *EMBO J.* **10**:1833–1842.

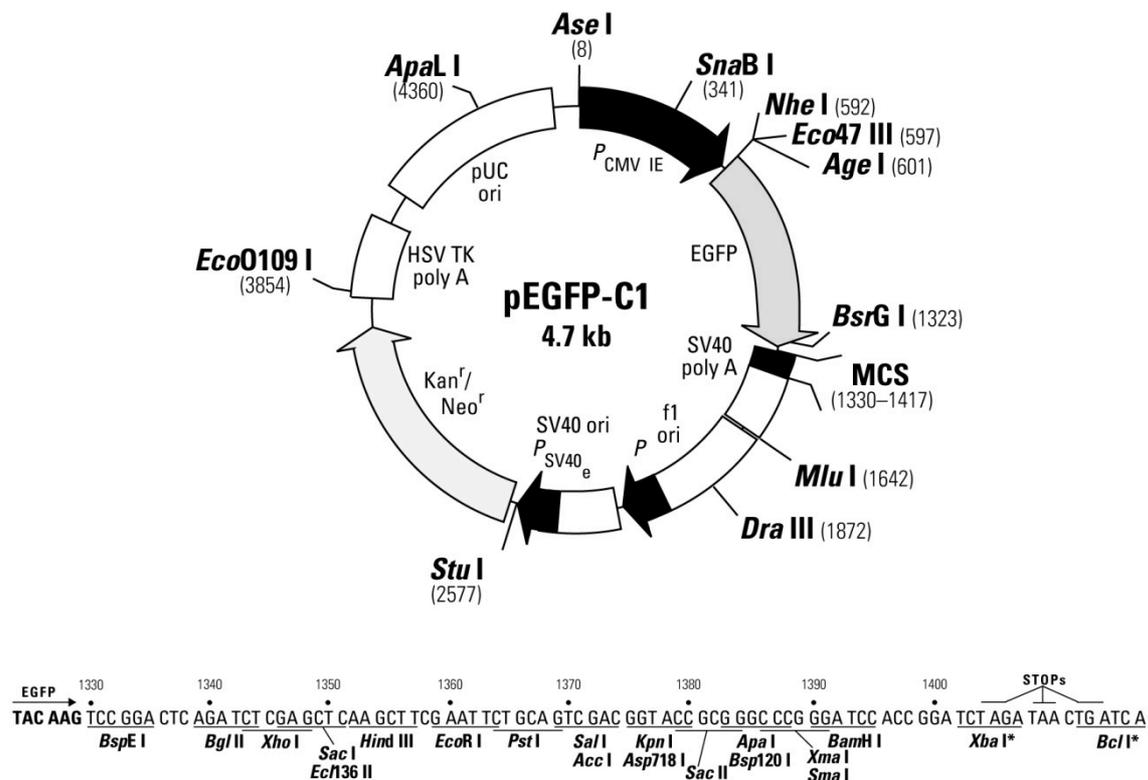
Note: The attached sequence file has been compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by Clontech. This vector has not been completely sequenced.

pEGFP-C1 Vector Information

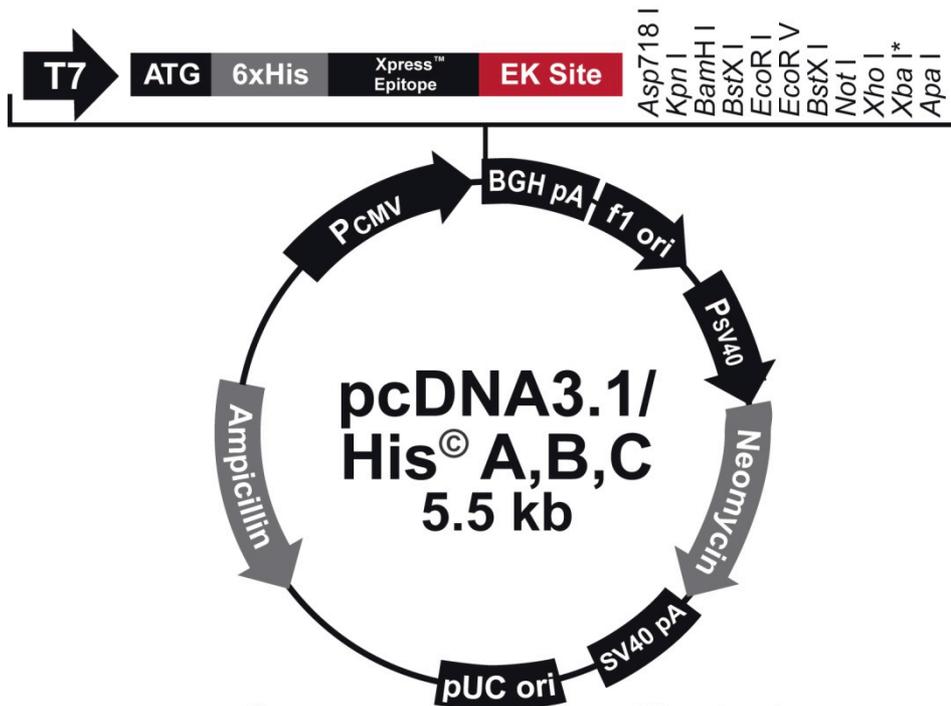
GenBank Accession #: U55763

PT3028-5

Catalog #6084-1

**Description**

pEGFP-C1 encodes a red-shifted variant of wild-type GFP (1–3) which has been optimized for brighter fluorescence and higher expression in mammalian cells. (Excitation maximum = 488 nm; emission maximum = 507 nm.) pEGFP-C1 encodes the GFPmut1 variant (4) which contains the double-amino-acid substitution of Phe-64 to Leu and Ser-65 to Thr. The coding sequence of the EGFP gene contains more than 190 silent base changes which correspond to human codon-usage preferences (5). Sequences flanking EGFP have been converted to a Kozak consensus translation initiation site (6) to further increase the translation efficiency in eukaryotic cells. The MCS in pEGFP-C1 is between the EGFP coding sequences and the SV40 poly A. Genes cloned into the MCS will be expressed as fusions to the C-terminus of EGFP if they are in the same reading frame as EGFP and there are no intervening stop codons. SV40 polyadenylation signals downstream of the EGFP gene direct proper processing of the 3' end of the EGFP mRNA. The vector backbone also contains an SV40 origin for replication in mammalian cells expressing the SV40 T-antigen. A neomycin resistance cassette (Neo^r), consisting of the SV40 early promoter, the neomycin/kanamycin resistance gene of Tn5, and polyadenylation signals from the Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV TK) gene, allows stably transfected eukaryotic cells to be selected using G418. A bacterial promoter upstream of this cassette expresses kanamycin resistance in *E. coli*. The pEGFP-C1 backbone also provides a pUC origin of replication for propagation in *E. coli* and an f1 origin for single-stranded DNA production.



**Comments for pcDNA3.1/His[©] A
5514 nucleotides**

CMV promoter: bases 209-863
 T7 promoter/priming site: bases 863-882
 ATG initiation codon: bases 920-922
 Polyhistidine region: bases 932-949
 Xpress[™] epitope: bases 989-1012
 Enterokinase recognition site: bases 998-1012
 Multiple cloning site: bases 1012-1085
 BGH reverse priming site: bases 1105-1122
 BGH polyadenylation signal: bases 1104-1318
 f1 origin: bases 1381-1794
 SV40 early promoter and origin: bases 1859-2183
 Neomycin resistance gene: bases 2219-3013
 SV40 polyadenylation signal: bases 3029-3268
 pUC origin: bases 3700-4373 (Complementary strand)
 Ampicillin resistance gene: bases 4518-5379 (Complementary strand)

*There is a stop codon following the Xba I site in version

pcDNA3.1/His[®] A MCS

839 CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA
 T7 promoter/priming site
 Hind III
 899 GCGTTTAAAC TTAAGCTTAC C ATG GGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT
 Met Gly Gly Ser His His His His His His His
 Polyhistidine (6xHis) region
 950 GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC
 Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr
 Xpress™ Epitope Asp718 I Kpn I BamH I BstX I* EcoR I
 998 GAC GAT GAC GAT AAG GTA CCT AGG ATC CAG TGT GGT GGA ATT CTG CAG
 Asp Asp Asp Asp Lys Val Pro Arg Ile Gln Cys Gly Gly Ile Leu Gln
 Enterokinase recognition sequence EK cleavage site
 EcoR V BstX I* Not I Xho I Xba I Apa I
 1046 ATA TCC AGC ACA GTG GCG GCC GCT CGA GTC TAG AGGGCCCGTT TAAACCCGCT
 Ile Ser Ser Thr Val Ala Ala Ala Arg Val ***
 BGH reverse priming site
 1099 GATCAGCCTC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC
 BGH poly (A) site
 1159 CTCCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC CTAATAAAAAT GAGGAAATTG

*Note that there are two *BstX* I sites in the polylinker.

pcDNA3.1/His[®] B MCS

839 CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA
 T7 promoter priming site
 Hind III
 899 GCGTTTAAAC TTAAGCTTAC C ATG GGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT
 Met Gly Gly Ser His His His His His His His
 Polyhistidine (6xHis) region
 950 GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC
 Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr
 Xpress™ Epitope Asp718 I Kpn I Bsu36 I BamH I BstX I* EcoR I
 998 GAC GAT GAC GAT AAG GTA CCT AAG GAT CCA GTG TGG TGG AAT TCT GCA
 Asp Asp Asp Asp Lys Val Pro Lys Asp Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala
 Enterokinase recognition sequence EK cleavage site
 EcoR V BstX I* Not I Xho I Xba I Apa I
 1046 GAT ATC CAG CAC AGT GGC GGC CGC TCG AGT CTA GAG GGC CCG TTT AAA
 Asp Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Ser Leu Glu Gly Pro Phe Lys
 BGH reverse priming site
 1094 CCC GCT GAT CAG CCT CGA CTG TGC CTT CTA GTT GCC AGC CAT CTG TTG
 Pro Ala Asp Gln Pro Arg Leu Cys Leu Leu Val Ala Ser His Leu Leu
 1142 TTT GCC CCT CCC CCG TGC CTT CCT TGA CCCTGGAAGG TGCCACTCCC
 Phe Ala Pro Pro Pro Cys Leu Pro ***
 BGH poly (A) site
 1189 ACTGTCCTTT CTAATAAAA TGAGGAAATT

*Note that there are two *BstX* I sites in the polylinker.

pcDNA3.1/His[®] C MCS

839 CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTGGCTA
T7 promoter priming site

899 GCGTTTAAAC TTAAGCTTAC C ATG GGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT
Hind III Polyhistidine (6xHis) region
Met Gly Gly Ser His His His His His His

950 GGT ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC
Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr

998 GAC GAT GAC GAT AAG GTA CCA GGA TCC AGT GTG GTG GAA TTC TGC AGA
Xpress[™] Epitope Asp718 I Kpn I BamHI BstX I* EcoR I
Asp Asp Asp Asp Lys Val Pro Gly Ser Ser Val Val Glu Phe Cys Arg
Enterokinase recognition sequence ▲ EK cleavage site

1046 TAT CCA GCA CAG TGG CGG CCG CTC GAG TCT AGA GGG CCC GTT TAA
EcoR V BstX I* Not I Xho I Xba I Apa I
Tyr Pro Ala Gln Trp Arg Pro Leu glu Ser Arg Gly Pro Val ***

1091 ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCTCC
BGH reverse priming site

1151 CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG TCCTTTCCTA ATAAAATGAG
BGH poly (A) site

1211 GAAATTGCAT

*Note that there are two *BstX I* sites in the polylinker.

A3) RT² Profiler PCR Arrays

A3.1) Array-Layout (96well)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	01	01	02	02	03	03	04	04	05	05	06	06	07	07	08	08	09	09	10	10	11	11	12	12
B	01	01	02	02	03	03	04	04	05	05	06	06	07	07	08	08	09	09	10	10	11	11	12	12
C	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
D	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21	21	22	22	23	23	24	24
E	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
F	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36
G	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47	48	48
H	37	37	38	38	39	39	40	40	41	41	42	42	43	43	44	44	45	45	46	46	47	47	48	48
I	49	49	50	50	51	51	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57	58	58	59	59	60	60
J	49	49	50	50	51	51	52	52	53	53	54	54	55	55	56	56	57	57	58	58	59	59	60	60
K	61	61	62	62	63	63	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	73
L	61	61	62	62	63	63	64	64	65	65	66	66	67	67	68	68	69	69	70	70	71	71	72	73
M	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82	83	83	84	84
N	73	73	74	74	75	75	76	76	77	77	78	78	79	79	80	80	81	81	82	82	83	83	84	84
O	HKG	GDC	GDC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC									
P	HKG	GDC	GDC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC	PPC									

Housekeeping
genes

Genomic
DNA
control

Reverse
transcription
controls

Positive
PCR controls

A3.2) Liste der analysierten Ionenkanäle sowie Referenzgene

Position	Unigene	GeneBank	Symbol	Description	Gene Name
A01	Mm.234998	NM_007384	Asic2	Amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin)	ACIC2, Accn1,
A02	Mm.440107	NM_009597	Asic1	Amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal	ASIC, ASIC1a, Accn2,
A03	Mm.299636	NM_183000	Asic3	Amiloride-sensitive cation channel 3	Accn3,
A04	Mm.31577	NM_011913	Best1	Bestrophin 1	Bmd, Vmd2, mBest1
A05	Mm.334658	NM_007578	Cacna1a	Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	Caca1a, Cav2.1,
A06	Mm.4424	NM_007579	Cacna1b	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	Cav2.2, Cchn1a,
A07	Mm.436656	NM_009781	Cacna1c	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	Cav1.2
A08	Mm.9772	NM_028981	Cacna1d	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	Cacn1a2
A09	Mm.29585	NM_009783	Cacna1g	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	Cav3.1d, a1G, alpha-1G
A10	Mm.291058	NM_001044308	Cacna1i	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 1I subunit	Ca(V)3.3
A11	Mm.41252	NM_031173	Cacnb1	Calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	CAB1, Cchb1, Cchl1b1
A12	Mm.313930	NM_023116	Cacnb2	Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	CAB2, Cavbeta2, Cchb2
B01	Mm.3544	NM_007581	Cacnb3	Calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	Ca(v)beta3, Cchb3
B02	Mm.400802	NM_007583	Cacng2	Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 2	stargazer, stargazin, stg, wag, waggler
B03	Mm.103724	NM_019431	Cacng4	Calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 4	AI413107, AW491861
B04	Mm.177761	NM_009900	Clcn2	Chloride channel 2	CIC-2, Clc2,
B05	Mm.25263	NM_007711	Clcn3	Chloride channel 3	Clc3
B06	Mm.270587	NM_011930	Clcn7	Chloride channel 7	CIC-7,
B07	Mm.343429	NM_010408	Hcn1	Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1	Bcng1, HAC2
B08	Mm.12956	NM_008226	Hcn2	Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 2	BCNG2, HAC1
B09	Mm.40424	NM_010595	Kcna1	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1	Kca1-1, Kv1.1, MBK1, Mk-1
B10	Mm.39285	NM_008417	Kcna2	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	Kca1-2, Kv1.2, Mk-2

B11	Mm.222831	NM_145983	Kcna5	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	Kv1.5
B12	Mm.62535	NM_013568	Kcna6	Potassium voltage-gated channel, shaker-related, subfamily, member 6	Kv1.6, MK1.6
C01	Mm.316402	NM_010597	Kcnab1	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1	Kvbeta1.1, mKv(beta)1
C02	Mm.388924	NM_010598	Kcnab2	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	F5, I2rf5, Kcnb3, kv-beta-2
C03	Mm.232472	NM_010599	Kcnab3	Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 3	Kcnab4, mKv(beta)4
C04	Mm.490804	NM_008420	Kcnb1	Potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 1	Kcr1-1, Kv2.1, Shab
C05	Mm.156081	NM_001098528	Kcnb2	Potassium voltage gated channel, Shab-related subfamily, member 2	BB130875, Kv2.2
C06	Mm.249386	NM_008421	Kcnc1	Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 1	KShIIIB, KV4, Kcr2-1, Kv3.1, NGK2,
C07	Mm.336242	NM_001025581	Kcnc2	Potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	KShIIIA, Kv3.2
C08	Mm.425316	NM_019697	Kcnd2	Potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 2	Kv4.2, R75121,
C09	Mm.44530	NM_019931	Kcnd3	Potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 3	AW045978, Kncd3, Kv4.3
C10	Mm.4489	NM_010600	Kcni1	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 1	Kv10.1, M-eag
C11	Mm.6539	NM_013569	Kcni2	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	ERG1, LQT, Lqt2, M-erg, Merg1, merg1a, merg1b
C12	Mm.374793	NM_010601	Kcni3	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3	Elk2, Kv12.2, Melk2
D01	Mm.343850	NM_001037712	Kcni6	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 6	m-erg2
D02	Mm.242532	NM_133207	Kcni7	Potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 7	Kv11.3, erg3
D03	Mm.390168	NM_019659	Kcnj1	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1	Kir1.1, ROMK, Romk2
D04	Mm.428799	NM_010602	Kcnj11	Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11	Kir6.2, mBIR
D05	Mm.4970	NM_010603	Kcnj12	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	IRK-2, IRK2, Kir2.2, MB-IRK2

D06	Mm.443539	NM_0011102 27	Kcnj13	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	-
D07	Mm.68170	NM_145963	Kcnj14	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14	IRK4, Kir2.4
D08	Mm.491313	NM_019664	Kcnj15	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	IRKK, Kir4.2
D09	Mm.30176	NM_010604	Kcnj16	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	Kir5.1
D10	Mm.4951	NM_008425	Kcnj2	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	IRK1, Kcnf1, Kir2.1
D11	Mm.5127	NM_008426	Kcnj3	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 3	GIRK1, Kcnf3, Kir3.1
D12	Mm.140760	NM_008427	Kcnj4	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	IRK3, Kcnf2, MB-IRK3
E01	Mm.69472	NM_010605	Kcnj5	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	GIRK4, Kir3.4
E02	Mm.328720	NM_010606	Kcnj6	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6	BIR1, GIRK2, KATP2, KCNJ7, Kir3.2, weaver,
E03	Mm.261168	NM_008429	Kcnj9	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9	Girk3, Kir3.3, mbGIRK3
E04	Mm.10800	NM_008430	Kcnk1	Potassium channel, subfamily K, member 1	TWIK-1
E05	Mm.486347	NM_010610	Kcnma1	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1	BKCa, MaxiK, Slo, Slo1, mSlo, mSlo1
E06	Mm.440652	NM_021452	Kcnmb4	Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	1700058G1 8Rik, 2900045G1 2Rik
E07	Mm.32074	NM_032397	Kcnn1	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 1	KCa2.1, SK1
E08	Mm.458654	NM_080465	Kcnn2	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2	KCa2.2, SK2, SKCA2, fri
E09	Mm.120250	NM_080466	Kcnn3	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3	KCa2.3, SK3, SKCA3
E10	Mm.453036	NM_008434	Kcnq1	Potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 1	KVLQT1, Kcna9

E11	Mm.440175	NM_010611	Kcnq2	Potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2	HNSPC, KQT2, Nmf134
E12	Mm.255585	NM_152923	Kcnq3	Potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 3	-
F01	Mm.6217	NM_008435	Kcns1	K ⁺ voltage-gated channel, subfamily S, 1	Kv9.1
F02	Mm.436657	NM_177652	Ryr3	Ryanodine receptor 3	RYR-3
F03	Mm.455125	NM_009134	Scn10a	Sodium channel, voltage-gated, type X, alpha	Nav1.8, PN3, SNS
F04	Mm.469833	NM_011887	Scn11a	Sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha	NSS2, NaN, NaT, Nav1.9, SNS2
F05	Mm.455166	NM_018733	Scn1a	Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha	Nav1.1
F06	Mm.1418	NM_011322	Scn1b	Sodium channel, voltage-gated, type I, beta	-
F07	Mm.433692	NM_001099298	Scn2a1	Sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1	Nav1.2, Scn2a
F08	Mm.491371	NM_001014761	Scn2b	Sodium channel, voltage-gated, type II, beta	Gm183
F09	Mm.330256	NM_018732	Scn3a	Sodium channel, voltage-gated, type III, alpha	Gm1000, Nav1.3
F10	Mm.385012	NM_001077499	Scn8a	Sodium channel, voltage-gated, type VIII, alpha	NaCh6, Nav1.6,
F11	Mm.440889	NM_018852	Scn9a	Sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha	Nav1.7, PN1,
F12	Mm.252987	NM_020333	Slc12a5	Solute carrier family 12, member 5	KCC2,
G01	Mm.186329	NM_177781	Trpa1	Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1	Anktm1, TRPA1b
G02	Mm.149633	NM_011643	Trpc1	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1	Mtrp1, Trp1, Trrp1
G03	Mm.74363	NM_019510	Trpc3	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3	Mwk, Trcp3, Trp3, Trrp3
G04	Mm.325086	NM_013838	Trpc6	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	TRP-6, Trrp6, mtrp6
G05	Mm.38875	NM_001039104	Trpm1	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Ltrpc1, Mlsn1, melastatin
G06	Mm.276762	NM_138301	Trpm2	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2	TRPC7, Trp7, Trrp7
G07	Mm.215171	NM_153417	Trpm6	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6	CHAK2, TRPM6, CHAK2
G08	Mm.218753	NM_134252	Trpm8	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8	CMR1, LTRPC6, LTrpC-6, TRPP8, Trp-p8
G09	Mm.447485	NM_001001445	Trpv1	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1	OTRPC1, TRPV1alpha, TRPV1beta

G10	Mm.288064	NM_011706	Trpv2	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	GRC, OTRPC2, VRL-1, Vrl1
G11	Mm.75196	NM_145099	Trpv3	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3	Nh, VRL3
G12	Mm.266450	NM_022017	Trpv4	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4	OTRPC4, Trp12, VR-OAC, VRL-2, VROAC
H01	Mm.391967	NM_007393	Actb	Actin, beta	Actx, beta-actin
H02	Mm.163	NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin	Ly-m11, beta2-m, beta2m
H03	Mm.304088	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd
H04	Mm.3317	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	Gur, Gus, Gus-r, Gus-s, Gus-t, Gus-u, Gut,
H05	Mm.2180	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa, Hsp84, Hsp84-1, Hsp90, Hspcb
H06	N/A	SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	MIGX1B
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	RTC
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control	PPC

B) Ergebnisse

B1) Kohortenstudien

B1.1. Allelfrequenzen (Häufigkeit) der SNPs rs712830 und rs712829 weltweit (Choi et al., 2007; Liu, Innocenti, Wu, & Desai, 2005)

Nukleotid- austausch	SNP-ID	Frequenz			
		Global	Kaukasier	Asien	Afro- amerikaner
- 216 G→T	rs712829	0,222	0,318	0,071	0,292
-191 C→A	rs712830	0,078	0,136	0,00	0,00

B1.2 Ausgewählte Parameter aus CARLA- und SHIP

Analysierter Parameter	Code CARLA	Code SHIP
Geschlecht	sex	sex
Alter	age	AGE_SHIP0
Body Mass Index	BMI	SOM_BMI
Waist-Hip-Ratio (Hüfte:Taille)	WHR	-
Systolischer Blutdruck (mmHg)	lr_sys	SYSBP_S0
Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min/1,73m ³)	GFR_MDRD	GFR_MDRD_S0
Creatinin (µmol/l)	CRE	-
Nt-Pro-BNP (pg/ml)	PBNP	-
High sensitive C-Reactive Protein	CRPHS	-
HBA1C (%)	HBA1C	HB1AC
Linksventrikuläre (LV) Masse	E_LVmass	-
LV Fractional Shortening (%)	E_pctFS	FS_S0
Corrected Ejection Fraction (Teichholz)	E_EFTz_korr	EF-Tz
LV Massen-Index	E_LVmass_index	LVMI_S0
Diabetes	diabetes2	DIABETES_S0

Hypertension/ Bluthochdruck	htn-kora	htn-kora
Chronic heart disease	chd2	chd2
Chronic vascular disease	cvd2	cvd2
Stroke (Schlaganfall)	stroke2	STROKE_S0
Myocardial infaction (Myokardinfarkt)	mi_final	MI
Systolic heart failure	chf_syst	-
Diastolic heart failure	chf_diast	-
Atrial fibrillation (Vorhofflimmern)	Afib_final	afib
Chronic heart failure (Herzversagen)	chf_total	-
Antihypertensive drugs (Blutdrucksenk. M.)	med_hyp	ANTIHYPER_S0
Antiarrhythmic drugs (Antiarrhythmika)	med_arrhyt	-
SNP-Frequenz rs712829	rs712829_code	rs712829_round
SNP-Frequenz rs712830	rs712830_code	rs712830_round

B1.3 Ergebnisse aus CARLA und SHIP

Zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Kluttig und Dr. Marcus Dörr

- **Odds Ratio Estimate = 1** → keine Unterschiede zwischen Referenz und getestetem SNP
- rs712829_code/-round : -216 G→T
- rs712830_code/-round: -191 C→ A
- Referenz: -216 G; -191 C

EGFR-Promotor	-216	-191	CARLA	SHIP	Kaukasier
MRE1.3	T/-	C/-	33 %	42 %	~ 32 %
MRE1.3-SNP1	G/-	A/-	18 %	19 %	~ 14 %
MRE1.3-SNP2	G/G	C/C	49 %	39 %	~ 54 %

CARLA:

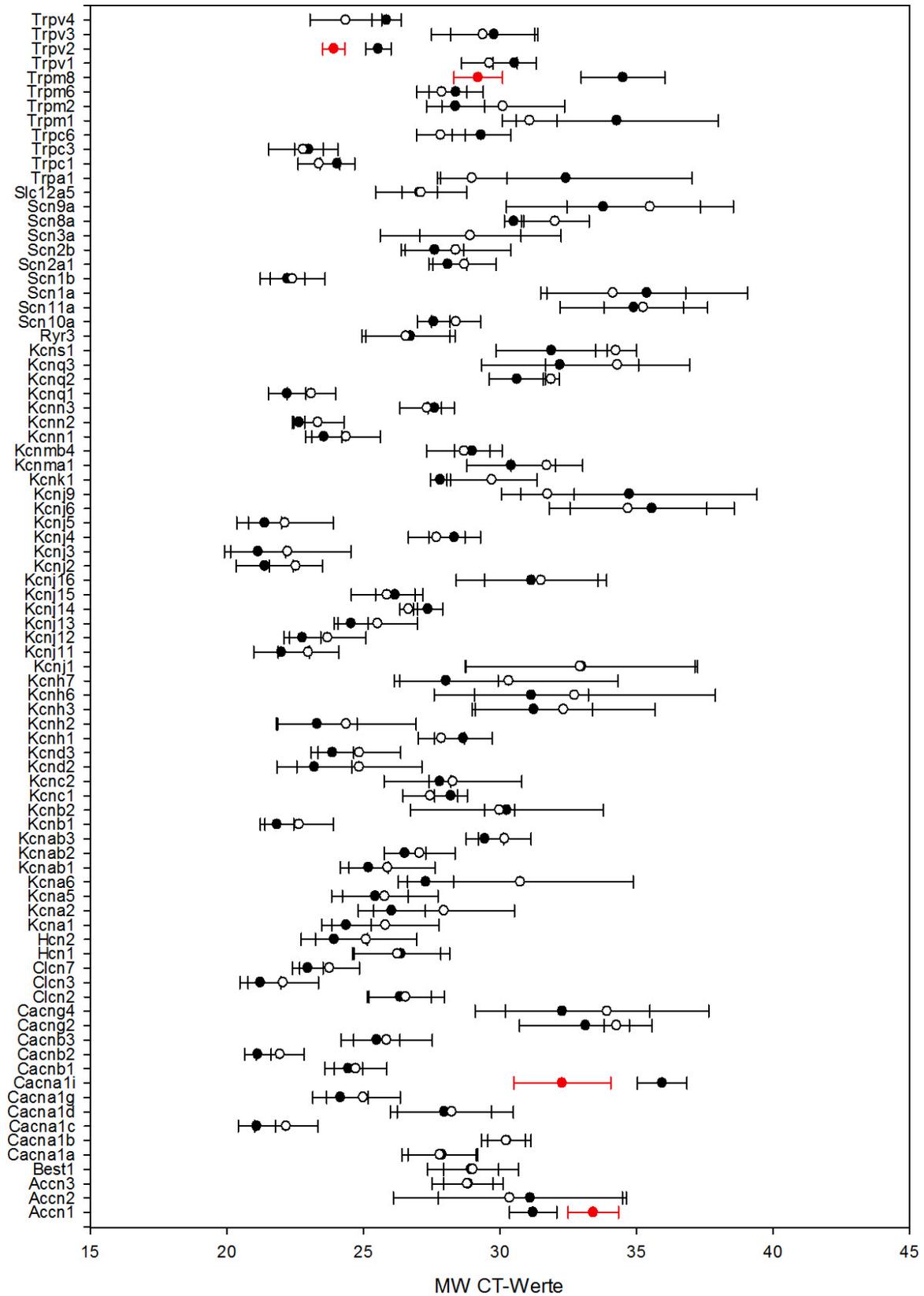
SNP	outcome	N	Odds Ratio Estimate	Lower 95% Confidence Limit for Odds Ratio	Upper 95% Confidence Limit for Odds Ratio
rs712829_code	GFR_kleiner_60	777	0.890	0.519	1.526
rs712830_code	GFR_kleiner_60	772	1.346	0.664	2.727
rs712829_code	htn_kora	778	0.898	0.714	1.130
rs712830_code	htn_kora	773	1.074	0.814	1.417
rs712829_code	cvd2	778	0.715	0.358	1.426
rs712830_code	cvd2	773	4.617	1.074	19.856
rs712829_code	chd2	778	0.550	0.235	1.289
rs712830_code	chd2	773	2.726	0.609	12.197
rs712829_code	chf_total	754	1.057	0.596	1.876
rs712830_code	chf_total	749	1.131	0.570	2.245
rs712829_code	mi_final2	778	0.563	0.232	1.366
rs712830_code	mi_final2	773	2.489	0.550	11.258
rs712829_code	Afib_final	778	2.184	0.456	10.451
rs712830_code	Afib_final	773	0.888	0.165	4.781
rs712829_code	Stroke2	778	0.916	0.264	3.182
rs712830_code	Stroke2	773	>999.99	<0.001	>999.999
rs712829_code	mc5	778	1.126	0.739	1.715
rs712830_code	mc5	773	0.750	0.468	1.203
rs712829_code	mc6	778	1.176	0.719	1.922
rs712830_code	mc6	773	0.784	0.454	1.354
rs712829_code	mc7	778	1.422	0.921	2.194
rs712830_code	mc7	773	1.338	0.779	2.300
rs712829_code	mc8	778	0.959	0.650	1.415
rs712830_code	mc8	773	0.884	0.557	1.403
rs712829_code	mc9	778	1.565	0.912	2.687
rs712830_code	mc9	773	0.862	0.476	1.563

SHIP:

SNP	outcome	N	Odds Ratio Estimate	Lower 95% Confidence Limit for Odds Ratio	Upper 95% Confidence Limit for Odds Ratio
rs712829_round	GFR_kleiner_60	4081	1.122	0.939	1.342
rs712830_round	GFR_kleiner_60	4081	0.934	0.752	1.159
rs712829_round	htn_kora	4068	1.066	0.958	1.186
rs712830_round	htn_kora	4068	1.002	0.882	1.138
rs712829_round	cvd2	4057	1.036	0.830	1.292
rs712830_round	cvd2	4057	0.858	0.661	1.114
rs712829_round	chd2	4065	1.179	0.914	1.521
rs712830_round	chd2	4065	0.729	0.549	0.970
rs712829_round	mi_final2	4065	1.183	0.907	1.544
rs712830_round	mi_final2	4065	0.737	0.548	0.991
rs712829_round	afib	3528	2.052	1.239	3.398
rs712830_round	afib	3528	0.654	0.405	1.057
rs712829_round	stroke_s0	4056	0.839	0.588	1.199
rs712830_round	stroke_s0	4056	1.253	0.778	2.018
rs712829_round	mc5	3539	1.163	1.007	1.343
rs712830_round	mc5	3539	0.956	0.805	1.135
rs712829_round	mc6	3539	0.939	0.777	1.135
rs712830_round	mc6	3539	0.961	0.766	1.205
rs712829_round	mc7	3539	1.046	0.879	1.246
rs712830_round	mc7	3539	1.173	0.946	1.455
rs712829_round	mc8	3539	0.935	0.815	1.073
rs712830_round	mc8	3539	0.917	0.780	1.078
rs712829_round	mc9	3539	0.793	0.622	1.012
rs712830_round	mc9	3539	1.156	0.854	1.566

B2) Ionenkanäle

B2.1. Konfidenzintervalle der mittleren CT-Werte der RT² Profiler PCR Arrays



C) Diskussion

C1) Aktionspotenziale und Leitfähigkeiten der Ionenkanäle in Kardiomyozyten und Schrittmacherzellen des Sinusknotens

Abbildungen entnommen aus:

Schmidt, Lang: „Physiologie des Menschen – mit Pathophysiologie“;

30. Auflage (2007); Springer Verlag; ISBN-10: 3540329080;

Kapitel 25; Seite 567 + 574 (Schmidt & Lang, 2007)

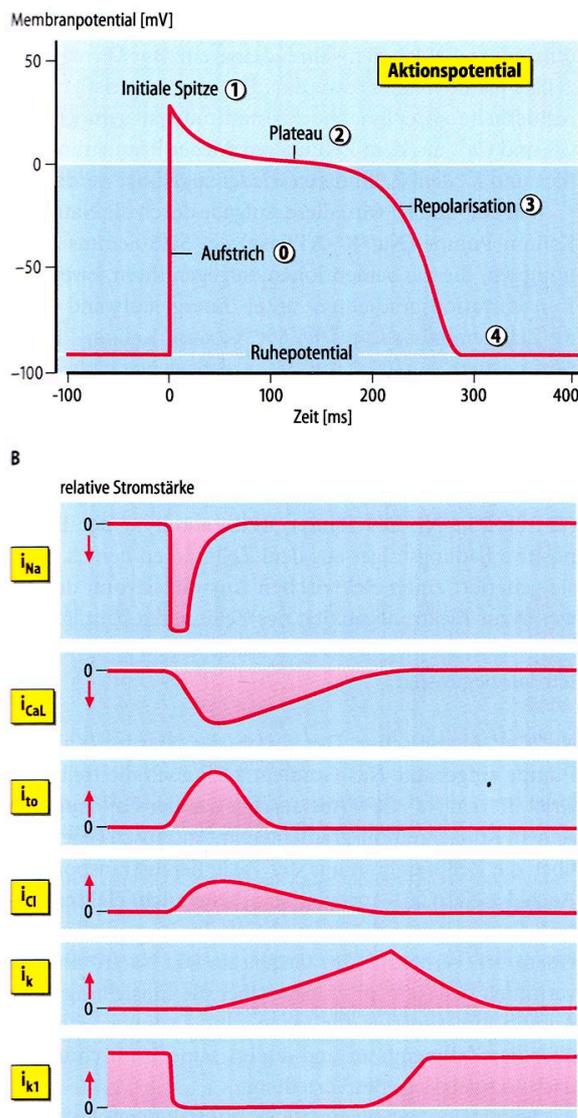


Abb. 25.1. Aktionspotential der Arbeitsmyokardzelle. **A** Das Aktionspotential lässt sich in fünf Abschnitte einteilen. Phase 0 ist eine schnelle Depolarisation (Aufstrich). Eine teilweise Repolarisation nach dem Aufstrich bestimmt die folgende Phase 1 (initiale Spitze), die in Phase 2 (Plateau) übergeht. Die endgültige Repolarisation (Phase 3) führt zurück zum Ruhemembranpotential (Phase 4). **B** Relative Stromstärken der beteiligten Ionenkanäle: i_{Na} Natriumstrom; i_{CaL} Kalziumstrom (L-Typ); i_{to} transienter Kaliumauswärtsstrom; i_{Cl} Chloridstrom; i_k verzögerter Gleichrichter; i_{k1} Einwärtsgleichrichter. Die Pfeile geben die Stromrichtung an: ↓ Einwärtsstrom; ↑ Auswärtsstrom. (Nach Piper in Schmidt u. Unsicker 2003)

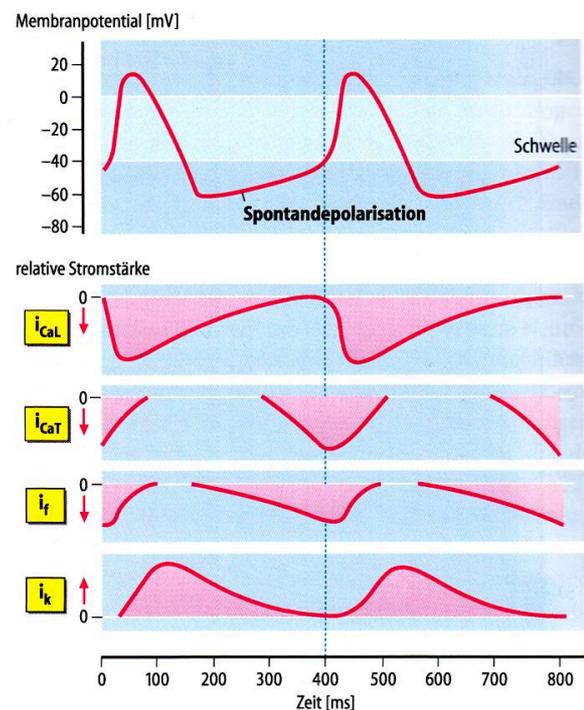


Abb. 25.8. Aktionspotential der Schrittmacherzellen des Sinusknotens. Oberste Kurve: Das Aktionspotential weist anfangs einen langsamen Anstieg auf. Es gibt keine Plateauphase. Nach Repolarisation auf einen tiefsten Wert von -60 mV depolarisiert die Zelle wieder spontan. Die anderen Kurven zeigen die relativen Stromstärken der beteiligten Ionenkanäle: i_{CaL} L-Typ-Kalziumstrom; i_{CaT} T-Typ-Kalziumstrom; i_f Schrittmacherstrom; i_k verzögerter Gleichrichter. Die Pfeile geben die elektrische Stromrichtung an: ↓ Einwärtsstrom, ↑ Auswärtsstrom. (Nach Piper in Schmidt u. Unsicker 2003)

Literatur:

- Choi, J. E., Park, S. H., Kim, K. M., Lee, W. K., Kam, S., Cha, S. I., ... Park, J. Y. (2007). Polymorphisms in the epidermal growth factor receptor gene and the risk of primary lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer*, 7, 199. doi:10.1186/1471-2407-7-199
- Liu, W., Innocenti, F., Wu, M., & Desai, A. (2005). A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Cancer Research*, 65, 46–53. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/1/46.short>
- Schmidt, R. F., & Lang, F. (2007). *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie* (Vol. 91, p. 979). doi:10.1007/978-3-540-32910-7

10. Danksagungen

Mein Dank gilt all denen, die diese Dissertation ermöglicht haben und mich während der Entstehung unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Frau **Jun.-Prof. Dr. Dr. Großmann** für die herausragende Betreuung, ständige Motivation, immerwährende Diskussionsbereitschaft sowie die Anregungen und Hilfestellungen, wenn Rat und Tat gebraucht wurden.

Ich möchte mich weiterhin besonders bei Herrn **Prof. Dr. Michael Gekle** für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die stetige begleitende Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und vielen Anregungen bedanken.

Frau **Prof. Dr. Karin Breunig** danke ich herzlich für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät I, die anregenden Diskussionen und Hilfestellungen.

Ein herzlicher Dank gilt den Technischen Assistentinnen **Katja Schumann, Nicole Strätz, Sigrid Mildenberger, Sindy Rabe** und **Bettina Schneider** für die tatkräftige Unterstützung in labortechnischen Angelegenheiten, die ständige und freundliche Hilfsbereitschaft bei kleinen und akuten Problemen sowie das Heranführen an verschiedene Labortechniken wie z.B. Zellkultur, Reporter-Gen-Assays, etc..

Frau **Dr. Stefanie Ruhs** danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die Unterstützung bei den Transkriptionsfaktor-ELISAs.

Weiterer Dank gilt Frau **Dr. Barbara Schreier** für das Bereitstellen der RNA aus Herzen und Kardiomyozyten von EGFR-Wildtyp- und EGFR-Knock-out-Mäusen. Außerdem danke ich **Prof. Dr. Ivo Große** und **Dr. Jens Keilwagen** für die Durchführung der bioinformatischen sowie **Dr. Alexander Kluttig** und **Dr. Markus Dörr** für die epidemiologischen Analysen.

Ferner möchte ich mich bei Frau **Dr. Constanze Mehlgarten** für die kritischen Anregungen zum Manuskript bedanken.

Bei den **Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie** bedanke ich mich für das außerordentlich gute Arbeitsumfeld, die kritischen und anregenden Diskussionen sowie Hilfestellungen bei Fragen und Problemen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, **Monika** und **Bernd Meinel**, sowie meinem Partner, **Daniel Wegner**, für die Geduld und Anteilnahme, mit der sie mich fortwährend unterstützt, motiviert und begleitet haben.

Ebenso danke ich meiner **Familie** und meinen **Freunden** für die Unterstützung.

11. Lebenslauf

RÖPZIGER STR. 8 • 06110 HALLE/SAALE
 TELEFON 0152/02841490 • E-MAIL SANDRA.MEINEL@YAHOO.DE

SANDRA MEINEL

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

- **Familienstand:** ledig
- **Nationalität:** Deutsch
- **Geburtsdatum:** 25.08.1982
- **Geburtsort:** Wolfen

AUSBILDUNG

- 09/1989 - 07/1993 Grundschule Döbeln Ost, Döbeln
- 09/1993 - 06/2001 Lessing-Gymnasium Döbeln
- **Abschluss:** **Abitur (1,8)**
- 10/2001 – 07/2007 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- **Studium der Biologie** mit den Schwerpunkten: **Genetik** (Hauptfach), **Mikrobiologie, Biochemie** und **Pflanzenphysiologie**
 - Abschluss:** **Diplom (1,3)**

BERUFSERFAHRUNG

- 06/2005 – 12/2005 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- **Arbeit als Hilfwissenschaftlerin in der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik**
- Kartierungsexperimente zur Analyse von Silencing-Suppressor-Mutanten in *Arabidopsis thaliana*, sowie Proteinaufreinigung, Western-Blot-Analysen, DNA-/ RNA-Isolation und Expressionsanalysen
- 08/2006 – 07/2007 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- **Diplomarbeit zum Thema: Molekulargenetische Analyse einer neuen putativen Nukleosomen-Remodeling-Funktion in *Arabidopsis thaliana*.**
- Kartierungsexperimente an einer Silencing-Suppressor-Mutante, Isolation von DNA und RNA, Expressionsanalysen mittels RT-PCR und real-time PCR, Immunozytologische Analysen (Antikörperfärbungen und Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) an Interphasekernen), Southern-Blot, Klonierung, Expressionsanalysen, Proteinaufreinigung, Western-Blot, Kreuzungsexperimente

08/2007 – 12/2009 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

■ **Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik**

Expressionsanalysen, real-time-PCR, Kartierungsexperimente, DNA-Methylierungsanalysen mittels Bisulfit-Sequenzierung, Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), Proteinaufreinigung, Western-Blot, Immunozytologische Analysen (FISH, Antikörperfärbung), Klonierung, Betreuung von Praktika

04/2010 – 11/2014 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

■ **Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie (Medizinische Fakultät)**

Zellkulturtechniken wie Zelltransfektion, Reporter-Gen-Assays und Durchlicht- sowie Fluoreszenzmikroskopie, Isolierung von DNA/RNA und Proteinen, Expressionsanalysen (Überexpression, Knock-down), qPCR, PCR, RT-PCR Arrays, Plasmidherstellung, Klonierungsexperimente, Bakterientransformation, Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), EMSA, ELISA, Western Blot, Immunopräzipitation, Immunozytologische Analysen, His-Tag-basierte Proteinaufreinigungen

SPRACHKENNTNISSE

Deutsch (fließend in Wort und Schrift)

Englisch (fließend in Wort und Schrift)

Französisch (Grundkenntnisse)

WEITERE KENNTNISSE

Computerkenntnisse:

MS-Office-Anwendungen: Word, Excel, PowerPoint, SigmaPlot (gut)

Adobe Photoshop CS, CorelDRAW (gut)

BioEdit, Edit Sequence (gut)

Clustal-X, iCycler-Software (gut)

Nutzung von Datenbanken und Online-Ressourcen (gut)

Führerschein Klasse B

12. Publikationen

- 1) **Meinel S**, Gekle M, Grossmann C. Mineralocorticoid receptor signaling: Crosstalk with membrane receptors and other modulators. *Steroids*. 2014 Jun 11, pii: S0039-128X(14)00130-5. [Epub ahead of print], Review
- 2) Gekle M, Bretschneider M, **Meinel S**, Ruhs S, Grossmann C. Rapid mineralocorticoid receptor trafficking. *Steroids*. 2014 Mar;81:103-8, Epub 2013 Nov 16, Review
- 3) **Meinel S**, Ruhs S, Schumann K, Strätz N, Trenkmann K, Schreier B, Grosse I, Keilwagen J, Gekle M, Grossmann C. Mineralocorticoid receptor interaction with SP1 generates a new response element for pathophysiologically relevant gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2013 Sep;41(17):8045-60.; Epub 2013 Jul 1
- 4) Ruhs S, Strätz N, Schlör K, **Meinel S**, Mildenerger S, Rabe S, Gekle M, Grossmann C. Modulation of transcriptional mineralocorticoid receptor activity by nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*. 2012 Sep 1;53(5):1088-100

Vorträge:

- 1) Mineralocorticoid Receptor-mediated EGF Receptor expression requires Specificity Protein 1.

Meinel S, Ruhs S, Gekle M, Grossmann C.

91. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Dresden 2012
Acta Physiologica 2012; Volume 204, Supplement 689:O28

Posterpräsentationen:

- 1) Mechanism of MR/aldosterone induced EGFR expression.

Meinel S, Ruhs S, Schwerdt G, Schumann K, Strätz N, Grosse I, Keilwagen J, Gekle M, Grossmann C.

ADMIRE COST Annual Meeting, Padua 2014

- 2) Mineralocorticoid receptor interaction with SP1 generates a new response element for pathophysiologically relevant gene expression.

Meinel S, Ruhs S, Schumann K, Strätz N, Trenkmann K, Grosse I, Keilwagen J, Gekle M, Grossmann C.

Meeting on Gene Regulation and Information Theory (GRIT), Halle/Saale 2013

- 3) Interaction between Mineralocorticoid Receptor and EGF receptor promoter involves SP1.

Meinel S, Ruhs S, Schumann K, Strätz N, Gekle M, Grossmann C.

Annual Meeting of the European Section of the Aldosterone Council (ESAC), Paris 2011

13. Eidesstattliche Erklärung

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

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

Name

Ort, Datum