

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt am Institut für Pharmakogenetik der
Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen
(PD Dr. Ulrich Frey)

**Untersuchungen zu den Genen
GRK2 und *GRK5* in Zusammenhang
mit der Expression kardialer
mikroRNAs und deren Bedeutung
bei Herzinsuffizienz**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Von Nina Danowski
aus Duisburg
München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Potschka
Korreferent/en: Priv.- Doz. Dr. Deeg
Tag der Promotion: 21. Juli 2012

Für meine Eltern

**Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bereits
publiziert oder auf Kongressen vorgestellt:**

1. N. Danowski, I. Manthey, E. Kottenberg, H. G. Jacob, W. Siffert, J. Peters,
U.H. Frey (2009):

**„Die Expression muskelspezifischer mikroRNA ist ein Marker für die
kardiale Leistungskraft bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung“**

50. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle
und Klinische Pharmakologie und Toxikologie – DGPT, Mainz, 2009

**“Decreased expression of microRNA miR-133a but not miR-1 is associated
with impaired cardiac performance”**

Kongress der Federation of American Societies for Experimental Biology
(FASEB), New Orleans, USA, 2009

**“Decreased expression of microRNA miR-133a but not miR-1 is associated
with impaired cardiac performance”**

Nina Danowski, Iris Manthey, Eva Kottenberg M.D., Heinz Günther Jakob
M.D., Winfried Siffert M.D., Jürgen Peters M.D. and Ulrich H. Frey M.D..

Eingereicht bei Cardiology

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	8
1.1. Veterinärmedizinische Bedeutung von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen und mikroRNAs in Zusammenhang mit Herzinsuffizienz	8
1.2. Gegenstand dieser Arbeit.....	16
2. Literaturübersicht	17
2.1. Signalübertragung zwischen Zellen	17
2.2. Funktion der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen	21
2.3. Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen und deren Eigenschaften.....	25
2.4. Bedeutung der GRK2 und GRK5 bei kardiovaskulären Erkrankungen	27
2.5. Die Gene <i>GRK2</i> und <i>GRK5</i>	32
2.6. Single nucleotide polymorphisms	34
2.7. Funktion und Bedeutung von mikroRNAs.....	36
2.8. mikroRNAs im kardiovaskulären System.....	41
2.9. Pathologisch veränderte Herz-Kreislaufparameter bei ACVB-Patienten	45
3. Material und Methoden.....	48
3.1. Material.....	48
3.1.1. Geräte.....	48
3.1.2. Verbrauchsmaterial	49
3.1.3. Medien.....	49
3.1.4. Biologisches Material	50
3.2. Methoden.....	53
3.2.1. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	54
3.2.2. Pyrosequenzierung	59
3.2.3. Arbeiten mit DNA.....	61
3.2.4. Arbeiten mit RNA.....	72
3.2.5. Zellkultur.....	77
3.2.6. Dual Glo Luciferase-Assay.....	80
3.2.7. Arbeiten mit Proteinen.....	83
3.2.8. Statistische Methoden.....	88

4. Ergebnisse.....	91
4.1. Identifizierung und Lokalisation der <i>GRK2</i> -Promotor- und 3' UTR SNPs.....	91
4.2. Untersuchungen zum Proteinbindungsverhalten des <i>GRK2</i> -Promotors und der 3' UTR.....	92
4.3. <i>In-silico</i> -Analyse potentieller Proteinbindungen an <i>GRK2</i> -Promotorsequenzen und der 3' UTR Sequenz.....	97
4.4. Funktionelle Untersuchung der Promotor- und 3' UTR-SNPs des <i>GRK2</i> Gens mittels Luciferase-Assay.....	98
4.5. Untersuchungen zur allgemeinen <i>GRK5</i> -Promotorcharakterisierung.....	103
4.6. Untersuchungen zu <i>GRK5</i> -Promotor SNPs – Genotyp abhängige Promotorcharakterisierung.....	109
4.7. Untersuchungen zum Proteinbindungsverhalten des <i>GRK5</i> -Promotors.....	120
4.8. Untersuchungen zur miR-1-, miR-133- und miR-208-Expression in Herzgewebe.....	125
5. Diskussion.....	138
5.1. Die <i>GRK2</i> -Promotor- und 3' UTR SNPs A(-1138)G, C(-1095)T, A(-43)G und A(+19,410)G.....	138
5.2. Untersuchungen zum <i>GRK5</i> -Promotor.....	141
5.3. Überblick zur miR-1-, miR-133- und miR-208-Expression in verschiedenen Geweben.....	143
5.4. Assoziation klinischer Herz-Kreislaufparameter und miRNA-Expression.....	144
5.5. Identifizierung potentieller Zielgene der miR-1, miR-133 und miR-208.....	146
5.6. Relevanz der Ergebnisse für die Veterinärmedizin.....	149
6. Zusammenfassung.....	153
7. Summary.....	157
8. Literaturverzeichnis.....	161
9. Anhang.....	179
9.1. Primer.....	179
10. Danksagung.....	184

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3' UTR	: 3' untranslatierte Region	mmol	: Millimol
ACE	: Angiotensin Converting Enzyme	mRNA	: messengerRNA
ACVB	: Aorto-Coronarer-Venen-Bypass	mV	: Millivolt
ADRBK1	: Beta-adrenerge Rezeptor Kinase 1	n	: Anzahl durchgeführter Versuche
Ang II	: Angiotensin II	ng	: Nanogramm
ANP	: Atriales natriuretisches Peptid	NLS	: DNA-binding nuclear localization sequenz
APS	: Ammoniumpersulfat	nm	: Nanometer
AT1	: Angiotensinrezeptor 1	NPPB	: Natriuretic peptide precursor B
ATG	: Adenin, Thymin, Guanin, Startcodon	NT-proBNP	: N-terminales proBNP
BMI	: Body Mass Index	NYHA	: New York Heart Association
BNP	: B-Typ natriuretisches Peptid	PAP	: Pulmonary artery pressure
bp	: Basenpaare	PCR	: Polymerase chain reaction
CAM	: Calmodulin	PCWP	: Pulmonary capillary wedge pressure
Ci	: Curie	PDGF	: Platelet derived growth factor
cpm	: counts per minute	pg	: Pikogramm
CVHD	: chronic valvular heart disease	PIP2	: Phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate
DCM	: dilated cardiomyopathy	PH-Domäne	: Pleckstrin homology - Domäne
DNA	: Desoxyribonukleinsäure	PKC	: Proteinkinase C
EMSA	: Electrophoretic mobility shift assay	PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acetate
g	: Gramm	qRT-PCR	: quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction
GDP	: Guanosindiphosphat	RAAS	: Renin-Angiotensin-Aldosteron- System
GPCR	: G-protein coupled receptor	RGS	: Regulators of G-Protein signaling
GRK	: G-protein coupled receptor kinase	RH-Domäne	: RGS homologe - Domäne
GTP	: Guanosintriphosphat	RISC	: RNA-induced silencing complex
HEK293	: Humane embryonale Nieren Zell-Linie	RNA	: Ribonucleinsäure
IL-1 β	: Interleukin 1- β	SNP	: Single nucleotide polymorphism
ISACHC	: International Small Animal Cardiac Health Council	SNS	: Sympathisches Nervensystem
kb	: Kilobase	SRF	: Serum response factor
KHK	: Koronare Herz Erkrankung	TEMED	: Tetramethylethan-1,2-diamin
L	: Liter	Tm	: Annealing Temperatur
LAD CAL	: left anterior descending coronary artery ligation	TNF- α	: Tumornekrosefaktor- α
mCi	: Millicurie	U / ml	: Units pro Milliliter
mg	: Milligramm	μ l	: Mikroliter
MHC	: Myosin heavy chain	ZKE	: Zellkernextrakte
min	: Minute		
miRNA	: mikroRNA		
ml	: Milliliter		
mmHg	: Millimeter Quecksilbersäule		

1. EINLEITUNG

1.1.

Veterinärmedizinische Bedeutung von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen und mirkoRNAs in Zusammenhang mit Herzinsuffizienz

In der Veterinärmedizin besitzen Herzerkrankungen aufgrund ihres häufigen Auftretens und begrenzter Therapiemöglichkeiten eine große Bedeutung. Kardiale Erkrankungen treten bei etwa 10 % aller in veterinärmedizinischen Praxen vorgestellten Hunden und Katzen auf. Bei 8 % der Hunde ist eine Herzerkrankung Todesursache. Damit stellt eine kardiale Erkrankung die vierthäufigste Erkrankung bei Hunden dar⁹⁹.

Die chronisch valvuläre Herzerkrankung (*chronic valvular heart disease*; CVHD) ist die häufigste Herzerkrankung beim Hund¹⁰⁰. Unter einer CVHD werden in der Literatur folgende Herzerkrankungen beschrieben: Mitralklappeninsuffizienz (*mitral valve regurgitation*; MR)¹⁰¹, Endokardiose (*endocardiosis*)¹⁰², degenerative Mitralklappenerkrankung (*degenerative mitral valve disease*; DMVD)¹⁰⁰, myxomatöse Atrioventrikularklappen-Degeneration (*myxomatous atrioventricular valvular degeneration*) und chronische Klappenfibrose (*chronic valvular fibrosis*). Die CVHD ist eine multifaktorielle Erkrankung und wird autosomal und polygen vererbt^{103,104}. Bisher konnte der genetische Defekt jedoch noch nicht identifiziert werden.

Die zweithäufigste kardiale Erkrankung beim Hund ist die dilatative Kardiomyopathie (*dilatative cardiomyopathy*; DCM)¹⁰⁵. Dabei sind häufiger mittelgroße und große Hunderassen wie Irish Wolfhound, Dogge, Doberman und Boxer betroffen. Erstmals wird eine DCM in der Regel in einem Alter von fünf bis sieben Jahren diagnostiziert¹⁰⁶. Als ursächlich für die Entwicklung einer DCM werden verschiedene Möglichkeiten wie Taurin- oder Carnitinmangel, infektiöse Erkrankungen, metabolische Störungen, immunologische Vorgänge und genetische Faktoren diskutiert¹⁰⁷. Da eine erhebliche Prädisposition der genannten Hunderassen besteht, ist von einer dominierenden Rolle der genetischen Faktoren bei der Pathogenese der Erkrankung auszugehen.

Herzerkrankungen unterschiedlicher Genese können bei längerem Bestehen zu einer Herzinsuffizienz führen. Dies ist auch bei einer DMVD oder DCM der Fall. Wie in der Humanmedizin bei einer Herzinsuffizienz belegt, konnte eine erhöhte Plasmakonzentration von Noradrenalin durch eine dauerhafte Aktivierung des sympathischen Nervensystems bei Hunden mit DMVD oder DCM beobachtet werden¹⁰⁸. Die Herzinsuffizienz stellt, sowohl in der Human-, als auch in der Veterinärmedizin, eine bedeutende Erkrankung dar, die sich in ihrer Manifestation zwischen den Organismen Mensch und Tier vergleichen lässt. Es konnten bereits viele Forschungsergebnisse aus der Humanmedizin auf die Veterinärmedizin übertragen werden und richtungweisend für weitere Forschungsprojekte sein. In Bezug auf die Herzinsuffizienz beinhalten diese z.B. eine Downregulation der β_1 -Rezeptoren bei anhaltender sympathischer Stimulation, wodurch die Ansprechbarkeit der adrenergen Rezeptoren auf endogene Katecholamine sinkt. Während der prozentuale Anteil der β_1 -Rezeptoren im gesunden, humanen Herzen noch 70 bis 80 % beträgt, sinkt dieser Anteil bei einer kongestiven Herzinsuffizienz auf etwa 50 %^{30,109,110}. Daraufhin konnte auch bei Hunden mit experimentell erzeugter Herzinsuffizienz eine Abnahme der β -Rezeptordichte (nicht differenziert nach β_1 und β_2) bestätigt werden¹¹¹. Eine selektive Abnahme der kardialen β_1 -Rezeptoren bei Hunden mit natürlich erworbener DCM konnte ebenfalls gezeigt werden¹¹². Zudem konnte eine Desensibilisierung und Downregulation von β_2 -Rezeptoren bei einer Herzinsuffizienz, sowohl beim Menschen, als auch beim Hund nachgewiesen werden¹¹³. Desensibilisierung und Downregulation von β_2 -Rezeptoren erfolgen durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs). Diese und weitere Studien suggerieren deutliche Übereinstimmungen in der Manifestation der Herzinsuffizienz und deren Pathophysiologie zwischen Mensch und Hund.

Dies lässt sich an der Therapie mit β -Blockern noch weiter verdeutlichen. β -Rezeptor-Antagonisten (β -Blocker) gehören in der Humanmedizin seit einigen Jahren zur Standardtherapie der kongestiven (mit Dilatation der Ventrikel einhergehenden) Herzinsuffizienz bei stabilen Patienten in allen Stadien¹¹⁴. Durch die Blockierung kardialer β -Rezeptoren reduzieren sie den, bei kardialen Erkrankungen, chronisch erhöhten adrenergen Stimulus am Herzen, der für die progressive Schädigung des Herzens verantwortlich gemacht wird¹¹⁵. Aufgrund ihrer negativ inotropen und chronotropen

Wirkung galten sie lange Zeit als kontraindiziert in der Therapie kardialer Erkrankungen, bis mehrere große, kontrollierte, klinische Studien die positiven Auswirkungen einer β -Blocker Therapie auf die Überlebensdauer herzkranker Patienten eindrucksvoll bestätigten¹¹⁶. Auch in der Veterinärmedizin liegen Studien zum klinischen Einsatz von β -Blockern in der Therapie kardial erkrankter Hunde vor. Einige experimentelle Studien untersuchten die Wirkung des β -Blockers Metoprolol. Die dreimonatige Gabe von Metoprolol konnte die im Tiermodell beobachtete typische progressive Dilatation der Herzkammern verhindern, während sich die systolische und diastolische Funktion des linken Ventrikels verbesserten¹¹⁷. Im Vergleich zur Kontrollgruppe besaßen mit Metoprolol behandelte Hunde eine höhere Ejektionsfraktion und entwickelten in geringerem Maße eine myokardiale Fibrose und ventrikuläre Hypertrophie. Der enddiastolische linksventrikuläre Druck und die enddiastolische linksventrikuläre Wandspannung sanken¹¹⁸. In einer weiteren Studie konnte eine geringere Apoptoserate der Kardiomyozyten in den mit Metoprolol behandelten Hunden im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren beobachtet werden¹¹⁹. Weitere Studien mit β -Blockern fanden an Hunden mit experimentell erzeugter Mitralklappeninsuffizienz statt. Es konnte gezeigt werden, dass Metoprolol die Freisetzung von Noradrenalin aus kardialen Neuronen in das kardiale Interstitium senkt^{120,121}. Hinsichtlich des klinischen Einsatzes von β -Blockern bei natürlich erkrankten Hunden, wurde der Einsatz von Metoprolol bei Hunden der New York Heart Association(NYHA)-Klassen I-III mit einer DCM oder CVHD untersucht¹²². Tidholm et. al.¹²³ berichteten retrospektiv über den Einsatz von Propranolol bei Hunden mit einer DCM (NYHA-Klasse IV). Beide Publikationen beschreiben, dass die β -Blockertherapie zu einer deutlichen Reduktion der Herzfrequenz führte und von den Hunden gut toleriert wurde. Die Dichte an β -Rezeptoren bzw. deren Ansprechbarkeit stellt auch beim Hund einen entscheidenden Faktor für den Verlauf der Herzinsuffizienz dar.

Die Dichte der β -Rezeptoren ist in starkem Maße abhängig von der GRK2- und GRK5-Aktivität am Herzen. Hohe GRK-Aktivität bedingt eine Abnahme der Rezeptordichte und verringert somit die Ansprechbarkeit des Herzens auf positiv inotrope Substanzen. Wie auch beim Menschen belegt, konnte bei Hunden der Zusammenhang einer Herzerkrankung mit einem Anstieg der GRK2-Aktivität beobachtet werden¹²⁴. Hier wurde bei Hunden eine Koronararterien-Ligation (*left*

anterior descending coronary artery ligation, LAD CAL) durchgeführt, die in einer Ischämie resultierte. Im Tiermodell wurde eine Abnahme der GRK2-Aktivität und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Isoproterenol 24 Stunden nach Ligation beobachtet. Niedrige GRK2-Aktivität geht also mit einer verminderten Desensibilisierung der Rezeptoren einher. Interessanterweise wurde aber keine Abnahme in der mRNA-Konzentration von GRK2 und GRK5 festgestellt. Dies lässt auf eine posttranskriptionelle Regulation der GRKs schließen¹²⁴. In der subakuten Phase der Ischämie kommt es also in diesem Modell zu einer Abnahme der GRK2-Aktivität, was eine sehr schnelle Regulierung des Enzyms erfordert. Dies könnte zum einen durch Inaktivierung der GRKs mittels Phosphorylierung geschehen, zum anderen besteht die Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation durch mikroRNAs (miRNAs).

Wie in der Humanmedizin scheinen also auch beim Hund, die GRKs eine besondere Bedeutung zu besitzen. Aufgrund der starken Rassedisposition der DCM wäre es sehr interessant, zu untersuchen, ob genetische Varianten des Promotors *single nucleotid polymorphism* (SNPs) des caninen *GRK2*- und *GRK5*-Gens einen Einfluss auf die GRK-Aktivität besitzen und somit die Progression einer Herzinsuffizienz beeinflussen können. Bisher gibt es jedoch keine Untersuchungen zu SNPs im *GRK2*- oder *GRK5*-Promotor beim Tier. Im Vergleich zu den human Isoformen handelt es sich bei der *GRK2* und *GRK5* um ein homologes Protein mit identischer Funktion in Säugerorganismen. Dabei ist die Sequenz der Gene unter den Spezies in hohem Maße konserviert (→ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=homologene&dopt=HomoloGene&list_uids=1223).

In dieser Arbeit sollen zudem Untersuchungen zu kardial exprimierten miRNAs als potentielle Genregulatoren durchgeführt werden. Da es sich bei Studien zur miRNA-Expression um ein relativ junges Forschungsgebiet handelt, gibt es bisher in der Veterinärmedizin nur wenige Studien zu kardialen miRNAs. Daher können die Ergebnisse dieser Arbeit auch für die Veterinärmedizin von Interesse sein. Die Sequenzen, der hier untersuchten miRNAs miR-1, miR-133 und miR-208 sind beim Mensch, Hund, Pferd und Rind nahezu identisch (→ vgl. <http://www.mirbase.org/index.shtml>)¹²⁵. Die Sequenzen der miR-1 und miR-133 unterscheiden sich bei Mensch und Hund um lediglich eine (miR-1) respektive zwei (miR-133) Basen (→ Tab. 1). Die Sequenz der miR-208 ist zwischen Mensch und Hund zu 100 % identisch¹²⁵.

→ Tab. 1:

Vergleichstabelle der miR-1-, miR-133- und miR-208-Sequenzen zwischen Mensch und Hund

	Homo sapiens	Canis familiaris
<i>miR-1</i>	uggaauguaaagaagua <u>u</u>	uggaauguaaagaagua
<i>miR-133</i>	<u>u</u> ugguccccu <u>u</u> caaccagcug	ugguccccu <u>u</u> caaccagcug <u>u</u>
<i>miR-208</i>	auaagacgagcaaaaagcuugu	auaagacgagcaaaaagcuugu

→ Tab. 1:

Abweichungen der Sequenzen zwischen den Spezies sind rot markiert.

In der Veterinärmedizin konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Genregulation und miRNA-Expression gezeigt werden. Dazu wurden einige Studien in der Onkologie durchgeführt, die mittels *MicroArrays* Expressionsprofile spezifischer miRNAs bei onkologischen Erkrankungen untersucht haben. Hier war das Ziel, canine miRNAs zu identifizieren, die für die Diagnose und Prognose onkologischer Erkrankungen herangezogen werden können und in Zukunft potentielle Therapieziele darstellen können. In einer Studie zu Mammatumoren beim Hund wurden die Expressionsprofile von miRNAs, die in der Humanmedizin mit Brustkrebs assoziiert werden konnten, in Gewebe von malignen Mammartumoren mit dem Expressionsprofil von unverändertem Mammargewebe verglichen. Neun von zehn untersuchten miRNAs wiesen dabei eine identische Expression zu humanem Gewebe auf¹²⁶.

Eine weitere Studie zu Nikotin-induziertem kardialem *Remodeling* bei Hunden konnte herausstellen, dass ein Nikotin-induziertes *Remodeling* am Herzen, stark abhängig von einer verminderten Expression der miR-133 ist¹²⁷.

Eine Expressionsanalyse zu porcinen miRNAs stellte zudem heraus, dass die miRNAs miR-1, miR-133 und miR-208 auch beim Schwein herzspezifische miRNAs darstellen¹²⁸. Die Expressionsmuster und Funktion dieser miRNAs scheinen also spezies-übergreifend zu sein.

Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass eine gewisse Vergleichbarkeit der miRNA-Expression und -Funktion zwischen den Spezies besteht. Da die miRNA-Sequenzen, der in dieser Arbeit untersuchten miRNAs, zwischen Mensch und Hund identisch sind, ist von einer ähnlichen Expression und Funktion dieser miRNAs auszugehen. Ebenso zeigt sich, ein nahezu identischer Pathomechanismus bei der Ausbildung einer Herzinsuffizienz bei Mensch und Hund. Dies kann durch diagnostische Marker, wie der N-terminales-proB-Typ natriuretisches Peptid (NT-proBNP) Plasmakonzentration und der NYHA Klassifizierung, verdeutlicht werden. Entsprechend den Erfahrungen aus der Humanmedizin konnten bei Hunden sowohl in experimentellen Studien¹²⁹, als auch bei Tieren mit natürlich erworbenen Herzerkrankungen^{130,131}, erhöhte Spiegel von natriuretischen Peptiden, Vasopressin und Zytokinen nachgewiesen werden^{132,133}.

In dieser Arbeit wurden Korrelationen zu diagnostischen Biomarkern wie NT-proBNP- und miRNA-Expression erhoben. Wie eingangs erwähnt zeigen Patienten mit einer Überbelastung des Herzens erhöhte NT-proBNP-Konzentrationen im Plasma. Auch in der Veterinärmedizin konnte gezeigt werden, dass erhöhte B-Typ natriuretisches Peptid (BNP)-Spiegel mit der Ausbildung einer symptomatischen DCM oder CVHD einhergehen^{131,134,135} und mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung korrelieren¹³⁶. Daher wird die Bestimmung des Plasma-BNP zur Diagnostik der Herzinsuffizienz auch in der Veterinärmedizin verwendet. Eine Bestimmung des NT-proBNP im Plasma besitzt den entscheidenden Vorteil, zwischen einer Dyspnoe unbekannter Genese und einer kardialen Erkrankungen zu differenzieren¹³⁷. Dabei ist jedoch zu beachten, dass der Schweregrad der Erkrankung für einen Anstieg des NT-proBNP von großer Bedeutung ist. Eine nicht klinisch manifeste CVHD oder DCM verursacht noch keinen Anstieg des NT-proBNP Plasma Spiegel. Daher ist ein *Screening-Test* für präklinische kardiale Erkrankungen ungeeignet^{131,134,138}. Hunde mit okkulten DCM dagegen zeigen erhöhte Konzentrationen von BNP im Plasma^{136,139}. Derzeit sind zwei Tests zur Bestimmung der BNP-Konzentration bekannt, der canine *CardioScreen NT-proBNP* Test (Guildhay Ltd., UK), der kommerziell erhältlich ist, und ein bisher noch nicht kommerziell erhältlicher Test der Firma *Biosite (Täby, Schweden)*, der in einer Studie angewandt wurde¹³⁶. Wie in der Humanmedizin beobachtet, korreliert auch beim Hund die BNP-Konzentration im Plasma mit dem Grad der Herzerkrankung.

Zusätzlich zu diesem diagnostischen und prognostischen Biomarker kann der Grad der Herzinsuffizienz in der Veterinärmedizin, ähnlich wie in der Humanmedizin, anhand der anamnestisch erhobenen NYHA-Klassifizierung eingeteilt werden. Entsprechend dem Auftreten klinischer Symptome sowie seiner Leistungsfähigkeit und Belastbarkeit wird der Patient in eine der vier bzw. drei Klassen eingeteilt. Das Schema wurde nach Morais und Schwartz¹⁴⁰ modifiziert und lässt sich mit dem Schema des *International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC)* vergleichen (→ Tab. 2).

→ Tab. 2:

Vergleichstabelle der NYHA- und ISACHC-Klassifizierung nach Morais und Schwartz

Funktionelle Klassifizierung nach NYHA		Funktionelle Klassifizierung nach ISACHC	
I	Herzerkrankung mit normaler Belastbarkeit	1	Zeichen einer Herzerkrankung ohne Symptome
		1a	Keine Vergrößerung des Herzens
		1b	Größenveränderung des Herzens
II	Herzerkrankung mit Beschwerden bei stärkerer Belastung; keine Symptome in Ruhe	2	Zeichen von leichter bis mittelgradiger Herzinsuffizienz, verminderte Leistungsfähigkeit, Dyspnoe bei Anstrengung, Husten, leichte Tachypnoe
III	Beschwerden bei leichter Belastung, keine Beschwerden in Ruhe		
IV	Beschwerden in Ruhe	3	Dyspnoe und Husten in Ruhe, schwere Leistungsschwäche, Zeichen von Ödemen
		3a	Ambulante Behandlung möglich
		3b	Hospitalisierung des Patienten

Zudem lässt die Homologie der GRK-Enzyme, sowie die starke Konservierung der Gensequenz zwischen den Spezies eine gewisse Übertragbarkeit der Ergebnisse zu. Daher sind die in dieser Arbeit zu untersuchenden Fragestellungen, auch für die Veterinärmedizin von Interesse. Es handelt sich sowohl bei der Herzinsuffizienz, als auch bei den Untersuchungen zu kardialen miRNAs, um klinische und in Zukunft vielleicht auch therapeutisch relevante Forschungsgebiete. Hinweise auf eine Korrelation zwischen klinischer Symptomatik der Herzinsuffizienz (z.B. NT-proBNP-Plasmakonzentration und NYHA-Klassifizierung) und miRNA-Expression bei *Aorto-Coronarer-Venen-Bypass* (ACVB)-Patienten, könnten somit auch in der Veterinärmedizin einen wichtigen Hinweis zu Pathomechanismen der Herzinsuffizienz geben und auf mögliche Zielgene kardialer miRNAs deuten.

1.2.

Gegenstand dieser Arbeit

Herzinsuffizienz ist ein multifaktorielles klinisches Syndrom, bei dem die kardi-ale Auswurfleistung nicht ausreicht, um den physiologischen Sauerstoffbedarf zu de-cken⁹⁷. Die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz in westlichen Ländern ist mit 60 bis 70% die Koronare Herzkrankheit (KHK). In der Framingham-Studie (*Framing-ham Heart Study*) konnte gezeigt werden, dass die koronare Herzkrankheit für 3/4 der Herzinsuffizienzfälle verantwortlich ist (→ www.framinghamheartstudy.org/risk/index.html). In diesem Zusammenhang wurde bereits die Bedeutung der GRKs für die Entwicklung und Progression einer Herzinsuffizienz bewiesen^{10,41,43}. Untersuchungen zur GRK2- und GRK5-Expression haben aktuelle Bedeutung, da diese Proteine die Desensibilisierung von β -Rezeptoren vermitteln^{18,25}. Diese Desensibilisierung ist bei ACVB (Aorto-Coronarer-Venen-Bypass)-Operationen zusätzlich gesteigert, führt zu einer myokardialen Dysfunktion und macht perioperativ häufig den Einsatz positiv inotrop wirkender Pharmaka notwendig.

Ziele dieser Arbeit sind daher zunächst *single nucleotid polymorphisms* (SNPs) im Promotor und der 3' UTR des *GRK2*- und *GRK5*-Gens zu identifizieren, die de-ren Expression beeinflussen. Dies erfolgt durch eine genetische und funktionelle Untersuchung dieser kardial relevanten Gene. Sequenzvarianten, die die Expres-sion beeinflussen, könnten bei Patienten mit Herzinsuffizienz sequenziert werden, um Aussagen zur Progression bzw. Prognose der Erkrankung zuzulassen. SNPs im Promotor des *GRK2*- und *GRK5*-Gens können die Expression des Proteins auf-grund unterschiedlichen Proteinbindungsverhaltens beeinflussen.

Das Proteinbindungsverhalten der identifizierten SNPs soll in einem Electro-phonetic mobility shift assay (EMSA) untersucht werden. Dieser *Assay* lässt zum einen Rückschlüsse auf die Größe des ggf. gebundenen Proteins zu, zum ande-ren lassen sich Aussagen über Allel-abhängige Bindungen treffen. In einem wei-teren Schritt soll die Verteilung der SNPs in mehreren Ethnien getestet werden, um Aussagen zu deren Relevanz treffen zu können. Zusätzlich soll in funktio-nellen Versuchen untersucht werden, ob die genetischen Varianten des *GRK2*- und *GRK5*-Promotors deren Aktivität beeinflussen. Dazu werden Promotorvarianten des

GRK2- und *GRK5*-Gens in unterschiedlichen Zellsystemen auf ihre Aktivität getestet. Ausgewählte pharmakologische Substanzen, wie Sympathomimetika und Interleukine, sollen zudem als Stimulationssubstanzen eingesetzt und deren Einfluss auf die Promotor-Aktivität untersucht werden. Die Messung der Promotor-Aktivität erfolgt im *Luciferase-Assay*.

Der *GRK5*-Promotor wurde bisher weder charakterisiert, noch auf SNPs untersucht, weshalb in dieser Arbeit zusätzlich eine Haplotypanalyse zu identifizierten SNPs sowie eine Charakterisierung einzelner Promotorabschnitte durchgeführt werden soll. Dadurch sollen die für die Expression der *GRK5* bedeutsamen Promotorabschnitte identifiziert werden. Dies erfolgt über die Generierung von Deletionskonstrukten, deren Aktivität mittels *Luciferase-Assay* bestimmt wird. Aufgrund von schnellen Veränderungen der *GRK*-Expression im Verlauf der Herzinsuffizienz ist die Genregulation durch miRNAs von besonderem Interesse, da diese aufgrund ihrer geringen Größe sehr schnell synthetisiert werden können⁶¹. Eine Genregulation durch miRNAs erfolgt über die 3`untranslatierte Region (3`UTR) der messengerRNA (mRNA) des Gens, weshalb die 3`UTR des *GRK2*-und *GRK5*-Gens ebenfalls auf SNPs untersucht werden soll. Diese können das Proteinbindungsverhalten (respektive *Silencer* oder *Enhancer*) beeinflussen, aber auch potentielle miRNA Bindungsstellen verändern. Daher wird die 3`UTR auf die Bindung möglicher Transkriptionsfaktoren im EMSA untersucht. Zudem wird der Einfluss der 3`UTR auf die Genaktivität im *Luciferase-Assay* untersucht, wobei Sequenzvarianten über eine Bindung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren die Genaktivität beeinflussen könnten.

Begründet durch die Bindung von miRNAs an die 3`UTR ihrer Zielgene und der daraus resultierenden Bedeutung für die postranskriptionelle Genregulation im kardialen System, soll in einem zweiten Schritt eine mögliche Korrelation der *GRK2*- und *GRK5*- Expression zur miRNA-Expression in Herzgewebe untersucht werden. Es stellt sich die Frage einer Korrelation der miR-1-, miR-133- und miR-208-Expression zu der der *GRK2* und *GRK5*. Dies ist von besonderem Interesse, da sowohl die miR-1, miR-133 und miR-208, als auch die Gene *GRK2* und *GRK5* eine große Bedeutung im kardialen System und bei der Entstehung und Progression kardialer Erkrankungen haben^{40,41,61,79,81,98}.

Bisher liegen keine Studien über die miRNA-Expression kardial relevanter Gene bei einer ischämisch bedingten Herzinsuffizienz in Folge einer koronaren Herzerkrankung (KHK) vor, daher soll dies in einem dritten Schritt anhand des Kollektivs der ACVB-Patienten untersucht werden, um eine mögliche Korrelation zwischen miRNA-Expression und klinischen Parametern der Herzinsuffizienz herzustellen. Daraus lassen sich folgende Fragestellungen ableiten: a) Wie stellt sich die Expression der miR-1, miR-133 und miR-208 im Kollektiv von ACVB-Patienten dar? b) Kann eine Korrelation zu drei voneinander unabhängigen klinischen Parametern beobachtet werden? c) Besteht eine Korrelation zwischen miRNA-Expression und dem Schweregrad der Herzinsuffizienz? d) Kann die Expression untersuchter miRNAs als Marker für den Schweregrad der Herzinsuffizienz genutzt werden?

Aufgrund der essentiellen Rolle der miRNAs im Herzen, ist es vorstellbar, dass es durch eine ischämisch bedingte Herzinsuffizienz zu einer Dysregulation dieser miRNAs kommt. Die quantitative Erfassung der miRNA-Expression erfolgt dabei mittels quantitativer *Realtime*-PCR (qRT-PCR) und *RNase protection Assay*.

Bedingt durch die Vielzahl der von miRNAs regulierbaren Gene, ist es wichtig, potentielle Zielgene dieser miRNAs zu identifizieren. Eine Zielgenbestimmung soll Aussagen über das mögliche Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, deren Progression und Prognose zulassen. Des Weiteren könnten sich Aussagen über die Wahrscheinlichkeit eines Einsatzes kardial relevanter Pharmaka ableiten lassen. Dies soll in einem vierten Schritt untersucht werden. Da miRNAs unter physiologischen Bedingungen die Quantität der mRNA ihrer Zielgene beeinflussen⁶¹, soll die mRNA-Expression ausgewählter Gene in Herzgewebe von ACVB-Patienten bestimmt und in Korrelation mit der miR-1, miR-133 und miR-208-Expression gesetzt werden. Dies soll Hinweise auf eine eventuelle Beeinflussung kardial relevanter miRNAs (miR-1, miR-133, miR-208) auf die Expression kardial relevanter Gene geben. Hierbei soll die mRNA-Expression von Genen untersucht werden, die ebenfalls kardial exprimiert und von Datenbanken als mögliche Zielgene der miRNAs postuliert werden. Die quantitative Erfassung der mRNA-Expression erfolgt ebenfalls mittels quantitativer *Realtime*-PCR (qRT-PCR).

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1.

Signalübertragung zwischen Zellen

Die Zellen vielzelliger Organismen werden während ihrer Entwicklung darauf programmiert, auf spezifische Signale zu antworten. Die Signale determinieren die Vitalität der Zelle, Zellteilung, Stoffwechsellleistungen und Apoptose. Damit Signalkaskaden in Zellen ablaufen können, müssen die jeweiligen Botenstoffe zu ihren spezifischen Zielzellen gelangen. Die häufigste Form der Signalübertragung ist die parakrine Ausschüttung von Botenstoffen. Dabei können die lokal abgegebenen Mediatoren nur auf unmittelbar benachbarte Zellen wirken und werden von diesen entweder rasch aufgenommen, immobilisiert oder zerstört. Die zentrale Beeinflussung von Zellen erfolgt über synaptische und endokrine Signalübertragung. Nervenzellen synthetisieren Neurotransmitter und wirken lokal auf postsynaptische Zellen, mit deren Axone sie in Verbindung stehen. Im Gegensatz dazu steht die endokrine Signalübertragung, bei der die von den Zellen abgegebenen Mediatoren ins Blut sezerniert werden und somit als Hormon zu Zielzellen im gesamten Organismus transportiert werden können¹. Die zelluläre Signalübertragung ist nur möglich, wenn extrazelluläre Signalmoleküle an entsprechende membranständige Rezeptorproteine einer Zelle binden. Auf die Bindung an den Rezeptor antworten die Zellen in programmierter und charakteristischer Weise. Kleine, lipophile Signalmoleküle, wie z.B. Steroide und einige lösliche Gase, beispielsweise Stickstoffmonoxid, können durch die Plasmamembran der Zielzellen diffundieren und in der Zelle selber wirken. Die meisten extrazellulären Signalmoleküle sind jedoch hydrophil und damit auf Rezeptorproteine an der Oberfläche der Zielzelle angewiesen, um eine spezifische Signalkaskade im Zytoplasma auszulösen. Bindet ein Ligand an solch einen Rezeptor, dann wirkt der Rezeptor als Signalüberträger. Die extrazelluläre Bindung zwischen Botenstoff und Rezeptor wird in ein intrazelluläres Signal, das das Zellverhalten beeinflusst, umgewandelt. Es lassen sich drei Hauptgruppen der membranständigen Rezeptoren unterscheiden: Zum einen gibt es Ionenkanalrezeptoren, die sich bei der Bindung eines Mediators kurzfristig

öffnen oder schließen. Zum anderen existieren katalytische Rezeptoren, die mit Enzymen assoziiert sind und spezifische Proteine phosphorylieren oder selbst enzymatische Wirkung besitzen.

Darüber hinaus gibt es die G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die membrangebundene Enzyme oder Ionenkanäle mit Hilfe von trimeren Guanosintriphosphat(GTP)-bindenden Proteinen (G-Proteine) aktivieren oder inhibieren. Es wird hier zwischen Adenylatcyclase-stimulierenden (Gs-Proteine), inhibierenden (Gi-Proteine) und unabhängigen (Gq-Proteine) G-Proteinen unterschieden. Bei letzteren erfolgt die Signalkaskade über die Phospholipase C. Davon abzugrenzen sind monomere GTP-bindende Proteine, die intrazelluläre Signale weiterleiten. Die meisten Signale werden durch eine kontrollierte Kaskade wechselwirkender Proteine von der Zelloberfläche zum Zellkern geleitet¹. Aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Rezeptoren durch den gleichen intrazellulären Botenstoff konvergieren, sowie durch die Verknüpfung verschiedener Signalkaskaden kann auf komplexe Weise z.B. das Genexpressionsmuster und infolgedessen auch der Phänotyp der Zelle reguliert werden².

GPCRs repräsentieren die größte Familie der signaltransduzierenden Proteine und stellen primäre Ziele der pharmakologischen Therapie dar³. Über extrazelluläre Domänen können sie spezifische Signalmoleküle erkennen und spielen eine zentrale Rolle für eine Vielzahl physiologischer Prozesse, wie Sehen, Riechen und Schmecken. Ferner werden u.a. Blutdruck, Herzmuskelaktivität und Glukosemetabolismus über GPCRs gesteuert. Bei der Bindung eines Agonisten an den Rezeptor wird eine Signalkaskade im Zytoplasma ausgelöst, wodurch letztlich Gene im Zellkern aktiviert oder inaktiviert werden. Die Signalkaskade der GPCRs kann – je nachdem welches G-Protein (Gi, Gs oder Gq) gebunden ist – über spezifische *second-messenger* Systeme verlaufen. Die molekularen Abläufe an GPCRs werden über die Aktivität von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) bestimmt und reguliert⁴. Bei der Signalübertragung zwischen Zellen sind GRKs somit von entscheidender Bedeutung. Sie gewährleisten die Umsetzung extrazellulärer Stimuli in intrazelluläre Antworten.

2.2.

Funktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen

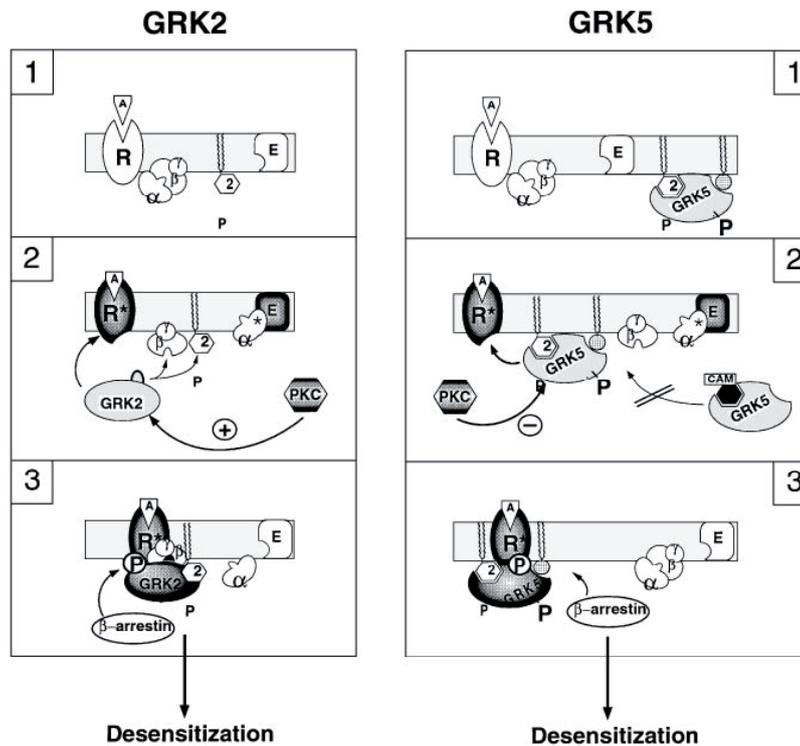
Ein biologisches System kann auf dauerhafte Signale mit einer verminderten Ansprechbarkeit reagieren, um auf neue oder stärker werdende Stimuli reagieren zu können. Diese Fähigkeit wird als Desensibilisierung oder Adaptation bezeichnet. Die physiologische Bedeutung dieses Vorgangs liegt in der Anpassung der Zelle auf dauerhafte Stimuli^{5,6}.

Im Falle von G-Protein-gekoppelter Signaltransduktion werden GPCRs bei anhaltender Stimulation durch GRKs mittels Endozytose ins Zytoplasma aufgenommen, um einer überschießenden Reaktion der Zelle entgegen zu wirken. Diese sog. „Downregulation“ der Rezeptoren an der Zelloberfläche führt zu einer verminderten Ansprechbarkeit der Zelle für den spezifischen Mediator. Die Dichte der Rezeptoren an der Zelloberfläche nimmt ab. Eine fehlende Internalisierung würde zu einer überschießenden Reaktion der Zelle führen⁷. Für die Internalisierung von GPCRs sind GRKs von entscheidender Bedeutung, indem sie GPCRs in das Zytoplasma aufnehmen, welche dort abgebaut werden oder rezirkulieren.

Die Desensibilisierung kann zum einen klassisch durch Rezeptorphosphorylierung oder alternativ durch direkte Bindung der GRKs an G-Proteine erfolgen. Damit GPCRs erfolgreich von GRKs desensibilisiert werden können, muss der entsprechende Agonist an den Rezeptor gebunden sein. Die Bindung eines Agonisten resultiert in einer Konformationsänderung des Rezeptors⁸. Dieser stimuliert über seine intrazelluläre Domäne die an den Rezeptor gekoppelten G-Proteine (→ Abb. 1, GRK2, 1).

→ Abb. 1:

Schematische Darstellung der Rezeptor-Desensibilisierung durch GRKs



→ Abb. 1:

Desensibilisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren durch die Rezeptorkinasen GRK2 und GRK5, nach Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G-protein-coupled receptor kinases.

Mit freundlicher Genehmigung von *Annu Rev Biochem* 1998;67:653-92.

Hierbei dissoziiert das heterotrimere G-Protein in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit. Bei der klassischen Desensibilisierung stimuliert die GTP-gebundene α -Untereinheit spezifische Effektoren (z.B. Effektorenzyme wie die Adenylzyklasen bei β -Rezeptoren oder Phospholipasen bei α_1 -Rezeptoren), welche *second messenger* synthetisieren (→ Abb. 1, GRK2, 2). Diese vermitteln die zelluläre Antwort und können neben anderen Proteinen die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Eine aktivierte PKC phosphoryliert die GRK2, was zu einer erhöhten Phosphorylierungsaktivität der GRK2 selbst führt. Damit die GRK2 den jeweiligen Rezeptor phosphorylieren kann, muss das Molekül zur Plasmamembran gelangen. Die

Fähigkeit zur Translokation des Enzyms besitzt die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins, welches an die sog. *Pleckstrin Homology Domain* (PH-Domäne) des GRK2-Moleküls bindet. Der *second messenger* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) kann ebenfalls die Translokation bedingen. Die *Protein Kinase Domain* (katalytische-Domäne) der GRK ermöglicht die Anlagerung an den GPCR, welcher in einem weiteren Schritt von der GRK phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung bedingt die Anlagerung von β -Arrestin. Durch die Bindung von β -Arrestin an den gebildeten Rezeptor-Kinase-Komplex wird eine Aktivierung der G-Proteine sowie von deren Effektoren (*second messenger*) verhindert (\rightarrow Abb. 1, GRK2, 3). Auf diese Weise wird der betroffene Rezeptor durch die initiale Phosphorylierung desensibilisiert und durch eine Clathrin-induzierte Endozytose in die Zelle aufgenommen⁴. Die Ansprechbarkeit eines Rezeptors kann so um 70 bis 80 % gemindert werden. Die GTP-gebundene α -Untereinheit inaktiviert sich nach der Hydrolyse des GTP zu GDP selbst und bindet sowohl an die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins, als auch an die dritte Domäne des GRK2-Moleküls, die *RGS Homology Domain* (RH-Domäne). Aufgrund der Anordnung dieser drei Domänen (PH-Domäne, katalytische-Domäne und RH-Domäne), werden GRKs auch als „dreiarmlige Proteine“ bezeichnet.

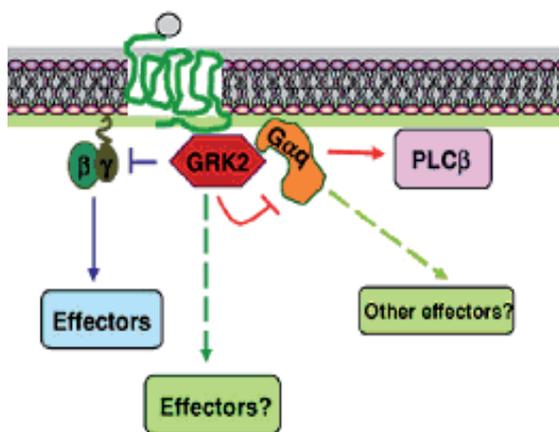
Anders als am Beispiel der GRK2 demonstriert, kann die Desensibilisierung eines GPCR auch durch Plasmamembran-gebundene GRKs erfolgen. Diese GRKs (\rightarrow Abb. 1, GRK5 1) lagern sich nach ihrer Synthese an die intrazelluläre Plasmamembran an und binden zusätzlich an Phospholipide, was sie zur Autophosphorylierung befähigt. Phospholipid-gebundene GRKs sind in der Lage, ohne Hilfe der $\beta\gamma$ -Untereinheit an aktivierte GPCRs zu binden. Die Phospholipid-Bindung der GRK kann durch Calcium/Calmodulin (CAM) inhibiert werden, ebenfalls wird die Fähigkeit der Rezeptorphosphorylierung durch Phosphorylierung der GRK mittels Proteinkinase C herabgesetzt (\rightarrow Abb. 1, GRK5, 2). Der weitere Schritt der Desensibilisierung verläuft auf dem bereits beschriebenen Wege der β -Arrestin-Bindung.

Alternativ kann die Desensibilisierung über direkte Bindung des GRK-Moleküls an den Rezeptor erfolgen. Man spricht von einer Phosphorylierungs-unabhängi-

gen Rezeptormodulation. Dies ist durch die direkte Interaktion der GRK mit der α -Untereinheit des Gq-Proteins (Gaq) möglich. Gaq moduliert die Aktivität von Effektorenzymen, wie der Phospholipase C, die die intrazelluläre *second messenger* Konzentration beeinflussen und die zelluläre Antwort auf einen Agonisten bedingen⁴. Bei einer Aktivierung des Gq-Proteins durch GPCRs kommt es zu einer Bindung von GTP an die $G\alpha$ -Untereinheit des Proteins, welche von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziiert⁹. Die sog. RH-Domäne der GRK2 ist in der Lage, an die Gaq-Untereinheit zu binden und so die Gaq-induzierte Phospholipase C Aktivität zu inhibieren (\rightarrow Abb. 2).

\rightarrow Abb. 2:

Desensibilisierung von GPCRs durch direkte Inhibierung der Gaq-Untereinheit



\rightarrow Abb. 2:

Phosphorylierungs-unabhängige Rezeptor Desensibilisierung über die GRK2, nach Ribas, C. et al. The G-protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Mit freundlicher Genehmigung von Biochim. Biophys. Acta* 1768, 913-922 (2007).

Die Aktivität der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen stellt somit einen bedeutsamen, adaptiven Prozess des Organismus dar, um auf wechselnde und anhaltende Rezeptorstimuli physiologisch reagieren zu können. Aufgrund der hohen Anzahl der Rezeptoren, die von GRKs reguliert werden, sind viele wichtige Vitalfunktionen von der intrazellulären GRK-Konzentration abhängig. Störungen

in der GRK-vermittelten Regulation der Rezeptoren führen, nicht kompensiert, zu pathologischen Veränderungen des jeweiligen Organsystems. Die intrazelluläre Konzentration der GRKs ist in starkem Maße von deren genetischer Expression abhängig. Hier ist der Promotor des *GRK*-Gens von besonderer Bedeutung, worauf im Folgenden näher eingegangen wird. Ebenso stellen kleinste RNA-Moleküle, sog. miRNAs, wichtige Genregulatoren dar, die über die Bindung an die mRNA der GRK-Gene, deren Expression modulieren können.

2.3.

Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen und deren Eigenschaften

Die GPCRs bilden eine Familie aus sieben Serin/Threonin-Protein-Kinasen⁹, die spezifisch durch Agonisten aktivierte GPCRs binden und diese, wie oben beschrieben, phosphorylieren. Basierend auf ihrer Sequenzhomologie und funktionellen Eigenschaften werden die GRKs in drei Subfamilien unterteilt, die Rhodopsinkinasen oder GRK-Subfamilie (GRK1 und GRK7), die β -adrenerge Rezeptorkinase oder GRK2-Subfamilie (GRK2 und GRK3) sowie die GRK4-Subfamilie (GRK4, GRK5, GRK6)^{4,9}. Mit Ausnahme der GRK1 und GRK7 (Expression nur in Retina), sowie der GRK4 (signifikante Konzentrationen nur in Hodengewebe) werden GRKs ubiquitär, jedoch gewebespezifisch stark unterschiedlich exprimiert. GRK2, GRK3 und GRK5 werden vornehmlich im Herzgewebe gebildet, wohingegen GRK4, GRK6 und GRK7 in diesem Gewebe kaum detektierbar sind¹⁰. GRK2, als Prototyp der kardial exprimierten GRKs, wurde im Zusammenhang mit der Desensibilisierung von β -Rezeptoren entdeckt und daher zunächst als β -adrenerge Rezeptorkinase 1 (ADRBK1) bezeichnet¹¹⁻¹³.

Es existieren Unterschiede in der Effizienz der GRKs, Rezeptoren zu desensibilisieren. GRK2 und GRK3 sind effizienter in der Desensibilisierung von Rezeptoren als GRK5 und GRK6^{14,15}. Zudem konnte gezeigt werden, dass nicht nur GPCRs von GRKs phosphoryliert werden können, sondern auch PDGF-Rezeptoren (*platelet-derived growth factor receptor*)¹⁶ und andere Proteine (z.B. Tubulin), die

Substrate für GRKs darstellen. Für die Interaktion mit Membranproteinen ist hier die C-terminale Domäne der GRK-Moleküle von besonderer Bedeutung. Sie enthält die PH-Domäne, die Bindungsstellen für das Phospholipid Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂) oder freie Gβγ-Untereinheiten besitzt¹⁷. Da das PIP₂ wichtig für die Translokation von GRKs ist, ist diese Bindungsstelle für den membran-gebundenen Teil der GRK2-Moleküle von besonderer Bedeutung, die sich sonst ähnlich der GRK3 frei im Zytoplasma befinden¹⁸. GRK4 und GRK6 dagegen sind konstitutiv membran-assoziiert und sind die einzigen GRKs, die Spleißvarianten besitzen. Die GRK5 ist ebenfalls membran-assoziiert und besitzt für die genaue Lokalisation an der Membran zwei separate Bindungsstellen^{19,20}. GRK1 und GRK7 sind ebenfalls vornehmlich membran-assoziiert.

GRKs stellen zudem Substrate für andere Kinasen dar, die zur Modulation der Kinaseaktivität, -lokalisation und -stabilität beitragen. Ein strukturelles Merkmal der GRK-Familie ist die bereits erwähnte Kinase-Domäne (*Protein-Kinase-Domain*), die in ihrer Sequenz unter den Subfamilien zu etwa 45 % konserviert ist⁹. Die Kinaseaktivität wird zum einen durch intramolekulare Interaktionen, zum anderen durch posttranskriptionelle Reaktionen durch andere Kinasen kontrolliert. Der intramolekulare Kontakt zu GPCRs oder Gβγ-Untereinheiten verursacht eine Konformationsänderung der Kinase, was zur Translokation und Aktivierung führt²¹. Die RH-Domäne (*RGS-Homology-Domain*) der GRKs interagiert spezifisch mit Gαq-Molekülen und stimuliert so die GTPase-Aktivität, wobei die Stimulation nicht so effizient ist, wie bei einer Aktivierung durch klassische RGS-Proteine (*Regulators of G-Protein Signaling*)²². Jedoch ist z.B. die GRK2 in der Lage die Gαq-vermittelte Phospholipase C-Aktivität potenter zu inhibieren als die RGS4²³. Neben diesen beschriebenen Interaktionen mit Rezeptoren sind GRKs zusätzlich in der Lage, sog. *non-receptor* Substrate zu phosphorylieren, wie z.B. Tubulin, was zu einer clathrin-induzierten Endozytose von Rezeptoren führt. Des Weiteren wurde eine *DNA-binding nuclear localization sequenz* (NLS) im GRK5-Molekül beschrieben, welche eine Bindung an DNA ermöglicht und somit eine Translokation der GRK5 in den Nukleus bei GPCR-Aktivierung²⁴.

Die Anzahl der identifizierten Proteine, mit denen GRKs interagieren können, ist in den letzten Jahren um ein Vielfaches gestiegen. Weiterführende Untersuchungen haben neue Mechanismen der Regulation durch die Kinasen gezeigt, welche auf zusätzliche biologische Funktionen der GRKs hindeuten. Änderungen in der GRK-Aktivität und -Expression wurden vor allem bei pathologischen Zuständen des Herz-Kreislaufsystems, wie z.B. der Hypertension oder Herzinsuffizienz beobachtet. Ursachen für Veränderungen, der GRK-Expression im Verlauf einer Erkrankung, gilt es daher zu untersuchen.

2.4.

Bedeutung der GRK2 und GRK5 bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den Industrieländern. Die Genese der Erkrankung kann dabei unterschiedlich sein, die häufigste Ursache stellt die koronare Herzerkrankung (KHK) dar, gefolgt von Bluthochdruck, Herzklappenerkrankungen und Kardiomyopathien. Bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen spezifische Adaptationsmechanismen des Herz-Kreislaufsystems eine entscheidende Rolle. Diese Mechanismen beeinflussen eine Vielzahl kardiovaskulärer Funktionen, bei denen wiederum GPCRs eine zentrale Rolle spielen. Zu den GPCRs, die bei diesen spezifischen Adaptationsvorgängen entscheidend sind, gehören u.a. α - und β -adrenerge Rezeptoren sowie Angiotensinrezeptoren. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren ist für die Adaptationsmechanismen des Herz-Kreislaufsystems essentiell. Gleichzeitig sind diese Rezeptoren primäre Zielmoleküle therapeutischer Substanzen³, z.B. bei der Therapie einer Hypertension (ACE-Hemmer, z.B. Captopril) und Herzinsuffizienz (Angiotensin-1-Antagonisten, z.B. Losartan, β -Blocker, z.B. Metoprolol, ACE-Hemmer). Diese o.g. Rezeptoren werden hauptsächlich durch die GRK2 und GRK5 reguliert, was ihre Bedeutung bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz unterstreicht.

Die GRK2 und GRK5 werden vornehmlich im kardialen Gewebe exprimiert und haben isoformspezifische Substrate²⁵. Die pathophysiologische Rolle der GRK2 und

GRK5 variiert im Verlauf der Erkrankung, da sich ihre Aktivität und Expression in der Pathogenese der Herzinsuffizienz entscheidend verändert. Um dies zu verdeutlichen, muss die Pathogenese der Herzinsuffizienz erläutert werden. Die häufigsten Ursachen für eine Herzinsuffizienz sind der Bluthochdruck und die KHK. Beides führt zu einer verminderten Inotropie des Herzmuskels. Eine Hypertonie kann am Herzen zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Hierzu zählen sowohl Gefäßveränderungen, die durch die Hypertension entstehen, als auch Erkrankungen des Herzens selbst. Der Herzmuskel muss gegen einen erhöhten arteriellen Druck arbeiten, als dies bei normalem Blutdruck nötig wäre. Es kommt zu einer chronischen Belastung des Myokards und damit zu einer Hypertrophie des Herzmuskels. Langfristig resultiert eine Dilatation, wodurch die Peripherie nicht mehr mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden kann. Es folgt eine Aktivierung neurohumoraler Regulationsmechanismen, die einen gesteigerten Sympathikotonus mit erhöhter Katecholaminausschüttung zur Folge haben. Die anhaltende Katecholaminausschüttung verursacht wiederum eine Desensibilisierung der β -Rezeptoren am Myokard und führt zur Abnahme der Inotropie.

Eine Hypertonie kann zusätzlich Gefäßveränderungen bedingen, die zum Krankheitsbild der KHK führen. Dabei kommt es durch einen chronisch erhöhten Blutdruck zu arteriosklerotischen Veränderungen der Koronargefäße. Das reduzierte Lumen der Koronargefäße führt zu einer verminderten Sauerstoffversorgung des Myokards und somit zur Herzinsuffizienz oder -infarkt.

Die verminderte Schlagkraft des Herzens führt ihrerseits zu einem herabgesetzten arteriellen Blutdruck sowie zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens, wodurch eine verminderte Durchblutung peripherer Organe und Gewebe resultiert. Als physiologische Reaktion des Körpers werden verschiedene neuroendokrine Regelkreise aktiviert, mit deren Hilfe eine ausreichende Organperfusion wieder hergestellt werden soll. Eine chronische Aktivierung dieser Systeme führt zu funktionellen, strukturellen und molekularen Veränderungen des Herzens, die als kardiales *Remodeling* bezeichnet werden, und zur Progression systolischer und diastolischer Funktionsstörungen beiträgt²⁶. Es entsteht ein *circulus vitiosus*, der letztlich die Dekompensation der Herzerkrankung und den Tod zur Folge hat²⁷.

Folgende neuroendokrine Regelkreise und Systeme werden im Verlauf einer kardialen Erkrankung und ihrer Progression zur Herzinsuffizienz aktiviert:

- Sympathisches Nervensystem (SNS)
- Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)
- Natriuretische Peptide

Als eines der ersten und wichtigsten Systeme zur Kompensation einer verminderten Inotropie wird das SNS aktiviert. Bei einem Abfall des arteriellen Blutdrucks, steigt vermittelt über Barorezeptoren im Aortenbogen und Karotissinus, der Tonus des SNS^{28,29} und die Ausschüttung seines Neurotransmitters Noradrenalin. Akut führt NA über kardiale β_1 -Rezeptoren zu einem Anstieg der Herzfrequenz und der myokardialen Kontraktilität³⁰, wodurch das Herzminutenvolumen gesteigert wird. Gleichzeitig vermittelt Noradrenalin über α_1 -Rezeptoren an den Gefäßen in der Peripherie eine Vasokonstriktion, in deren Folge der periphere Widerstand wächst und der verminderte arterielle Blutdruck wieder auf ein physiologisches Maß angehoben wird. Bei der Herzinsuffizienz führt die bestehende Dysfunktion des Herzens zu einer kontinuierlichen Stimulation des SNS und dauerhaft erhöhten Plasmaspiegeln von Noradrenalin. Diese chronische Aktivierung ist maßgeblich an der Progression der Erkrankung beteiligt²⁹. Der Pathomechanismus besteht hier in der Desensibilisierung der β_1 -Rezeptoren durch dauerhafte Aktivierung des SNS und dessen Transmittern. Trotz steter Stimuli kann der Herzmuskel aufgrund desensibilisierter Rezeptoren nicht mehr auf Signale reagieren, was letztlich zu einer Dekompensation und zum Tod führt. Belegt wird dies eindrücklich durch Untersuchungen, die die Höhe der kardialen Noradrenalin-Konzentration als einen starken prognostischen Marker für einen tödlichen Ausgang der Erkrankung identifizierten³¹. Weitere Folgen eines erhöhten Sympathikotonus sind eine gesteigerte Erregbarkeit der Herzmuskelzellen, die die Gefahr für das Auftreten von Arrhythmien erhöht^{32,33}, sowie eine Aktivierung des RAAS vermittelt über β_1 -Rezeptoren am juxtaglomerulären Apparat der Niere³⁴.

Des Weiteren ist das adrenerge Rezeptorsystem an strukturellen Veränderungen des Myokards, wie Hypertrophie³⁵ und Fibrosierung beteiligt. Im Verlauf einer Herzerkrankung finden kardiale *Remodeling*-Prozesse statt, die zur Progression der Erkrankung beitragen und letztendlich in die Dekompensation münden. Das kardiale *Remodeling* wird nach dem *International Forum on Cardiac Remodeling* als genetische, molekulare, interstitielle und zelluläre Veränderung des Herzmuskels definiert²⁶. Der Herzmuskel reagiert auf die verminderte Inotropie zunächst mit einer Hypertrophie, die die fehlende Schlagkraft kompensieren soll. Es handelt sich dabei, um einen adaptiven Prozess, der der Funktionserhaltung dienen soll. Langfristig kommt es jedoch, durch verminderte Auswurfleistung und Fibrosierung des Herzens, zu einer Verschlechterung der Herzinsuffizienz. Zusätzlich haben chronisch erhöhte Plasmakonzentrationen von Noradrenalin eine direkte kardiotoxische Wirkung, was eine Dysfunktion, Apoptose und Nekrose von Myozyten zur Folge hat³⁶.

Die Rezeptoren des SNS werden von GRKs reguliert. Im Verlauf der Progression der Herzinsuffizienz werden kardiale β -Rezeptoren „down-reguliert“ bzw. desensibilisiert. Die Desensibilisierung von β -Rezeptoren erfolgt durch die GRK2 und GRK5^{37,38}. Die GRK2 und GRK5 kompensieren somit zunächst eine anhaltende Aktivierung des Sympathikus. Im weiteren Verlauf der Herzinsuffizienz kann es durch den stets heraufgesetzten Sympathikotonus zu einer drastischen und anhaltenden Aktivierung der GRKs kommen. Dies hat eine erhebliche Internalisierung der β -Rezeptoren am Herzen zur Folge. Dadurch können positiv inotrope Substanzen, wie Adrenalin oder Dobutamin, die Schlagkraft des Herzens nicht ausreichend erhöhen²⁵. Zusätzlich wird durch die Noradrenalin-vermittelte Erhöhung der peripheren Vasokonstriktion, die Nachlast am Herzen erhöht, wodurch die kardiale Auswurfleistung gesenkt wird. Dies wiederum führt zu einer erneuten neuro-endokrinen Stimulation. Es kommt zum *Circulus vitiosus*, der schließlich zu einer dekompensierten Herzinsuffizienz führt.

Ein Anstieg der GRK2- und GRK5-Aktivität führt also im fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz zu einer Abnahme der kardialen Leistungskraft, da zum einen die Rezeptordichte der Kardiomyozyten stetig herunter reguliert wird und es zeitgleich zu einer Desensibilisierung der Rezeptoren durch die GRKs kommt.

Von unabhängigen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte GRK2- und GRK5-Expression mit einer kardialen Dysfunktion einher geht^{18,39}. Studien zur GRK2 haben diese als einen kritischen Regulator kardialer β -Rezeptoren dargestellt⁴⁰. Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression der GRK2, die kardiale Leistungskraft weiter herabsetzt und zu einer erhöhten Mortalität führen kann⁴⁰. Des Weiteren besteht eine Korrelation der GRK2-Expression und -Aktivität mit einer Dysregulation von α_2 -Adrenozeptoren, wie sie bei Herzinsuffizienz auftritt. Hier wird die Dysregulation der Rezeptoren durch einen Anstieg der GRK2-Expression gesteigert^{37,41}, was die GRK2 als mögliches sympatholytisches Zielmolekül identifiziert. Untersuchungen zur Progression einer Herzinsuffizienz ergaben einen deutlich schnelleren Verlauf der Erkrankung bei hoher GRK2-Expression⁴². Weitere Studien zeigten, dass hohe GRK2- und GRK5-Konzentrationen mit erhöhten Angiotensin II (Ang II)-Konzentrationen und einer Hypertension einhergehen^{25,43}. Die Aktivierung des RAAS beginnt mit einer vermehrten Freisetzung von Renin im juxtaglomerulären Apparat der Niere. Die Ausschüttung wird durch die Bindung von Noradrenalin an β_1 -Rezeptoren stimuliert. Renin katalysiert die Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I. Dieses wird durch das *Angiotensin converting enzyme* (ACE) zu Angiotensin II konvertiert⁴⁴. Angiotensin II wirkt sowohl arteriell als auch venös vasokonstriktorisch, wodurch am Herzen die Vor- und die Nachlast erhöht werden. Der Blutdruck steigt darauf hin an. Zudem erhöht sich der Sauerstoffbedarf des Myokards. Da Angiotensin II-Rezeptoren ebenfalls Substrate der GRK2 sind, ist deren Expression auch für das RAAS von Bedeutung.

Zusammenfassend ist die initiale Reaktion des Organismus auf eine Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese stets durch schnelle Regelmechanismen gekennzeichnet. Dies bedingt eine schnelle Regulierung verschiedener Adaptationsmechanismen (Aktivierung des SAS und RAAS) sowie der Expression und Aktivierung der GRK2 und GRK5. Eine schnelle Aktivierung der GRKs konnte von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden³⁻⁵. Dies ist zum Beispiel durch die Autophosphorylierung der GRK5 möglich⁴⁵. Um die schnelle Aktivierung einer entsprechenden Anzahl von GRK-Molekülen zu gewährleisten, ist eine entsprechende GRK-Expression Voraussetzung. Die genetisch bedingte Expression der GRK-Moleküle bestimmt somit den Grad der GRK-Aktivität.

Da es im Verlauf der Herzinsuffizienz zu einer pathophysiologischen Änderung der Genexpression kommt, sind Regulationsmechanismen der *GRK2*- und *GRK5*-Gene von großem Interesse.

2.5.

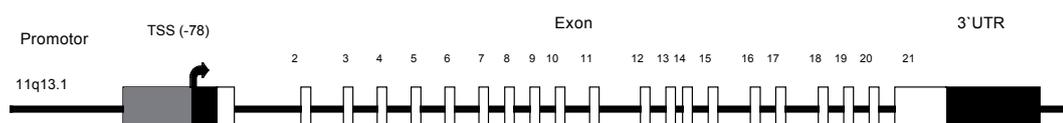
Die Gene *GRK2* und *GRK5*

Für die Expression eines Gens ist sein Promotor essenziell. Die wichtigste Eigenschaft eines Promotors ist die spezifische Wechselwirkung mit bestimmten DNA-bindenden Proteinen. Diese werden als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Durch direkte Bindung an die DNA wird der Promotor entweder aktiviert oder reprimiert. Man unterscheidet hier zwischen *Enhancern*, die durch ihre spezifischen Eigenschaften die Promotor-Aktivität erhöhen und *Silencern*, die die Promotor-Aktivität hemmen. Transkriptionsfaktoren haben also einen direkten Einfluss auf die mRNA Konzentration⁴⁶. Die transkribierte mRNA kann nach dem *Splicing* noch weiter durch posttranskriptionelle Genmodulatoren modifiziert werden. Dies geschieht über die 3' UTR.

Das *GRK2*-Gen ist 23 kb groß und besteht aus 21 Exons, die von 20 Introns unterbrochen werden. Die Exon-Größe variiert von 52 bp des Exon 7 bis zu 1200 bp des Exon 21. Die maximale Größe der Introns liegt bei 10,8 kb. Der Haupttranskriptionsstartpunkt wurde 246 bp vor dem ATG Start lokalisiert⁴⁸.

→ Abb. 3:

Schematische Darstellung der *GRK2*-Genstruktur



→ Abb. 3:

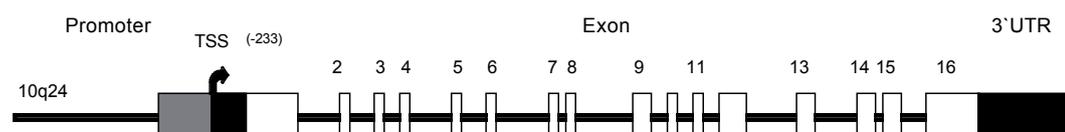
Lokalisation und Aufbau des *GRK2*-Gens

Eine Analyse des *GRK2*-Promotors zeigte wesentliche Merkmale eines sog. *House-keeping* Gens durch das Fehlen einer TATA-Box und CAAT-Box, einen hohen GC-Gehalt der Sequenz und das Vorhandensein von Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Sp1. Der hohe GC-Gehalt (>80%) der 5`flankierenden Region wurde als zentraler Bestandteil der Regulation der Genexpression postuliert⁴⁸. Eine weitere Studie konnte die Promotor-Aktivität der *GRK2* in verschiedenen Zelllinien beschreiben. Es wurden u.a. glatte Muskelzellen der Aorta aus Ratten (A10-Zellen) und humane embryonale Nierenzellen (HEK293) verwendet. Substanzen, wie Phorbol ester, die physiologisch eine Vasokonstriktion auslösen, verursachten einen Anstieg der *GRK2*-Promotor-Aktivität. Dies führt zu einer gesteigerten Expression des *GRK2*-Proteins. Ebenso verursachte die Cotransfektion von Gαq-Untereinheiten einen Anstieg der Promotor-Aktivität. Im Gegensatz dazu verursachen proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1β (IL-1β) oder Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) eine Abnahme der Promotor-Aktivität⁴⁹. Dies lässt darauf schließen, dass die *GRK2*-Expression auf transkriptioneller Ebene durch ein Zusammenspiel extrazellulärer Mediatoren kontrolliert wird.

Das *GRK5*-Gen befindet sich auf Chromosom 10q24 und besteht aus 16 Exons und 15 Introns. Die Exons stellen sich in ihrer Gesamtgröße mit etwa 2,5 kb dar und werden von bis zu 118 kb großen Introns unterbrochen. Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich an Position -233 vor dem ATG-Translationsstartpunkt, wobei es sich durch Datenanalyse erhobene Ergebnisse handelt. (CHIP Bioinformatics Tools, SNPper, → www.snpper.chip.org). Bislang wurde der *GRK5*-Promotor noch nicht experimentell untersucht.

→ Abb. 4:

Schematische Darstellung der *GRK5*-Genstruktur



→ Abb. 4:

Lokalisation und Aufbau des *GRK5*-Gens

Da die Expression der GRK2 und GRK5 in entscheidendem Maße vom Promotor des jeweiligen Gens abhängt, können Sequenzabweichungen große Auswirkungen auf Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren haben und so eine Änderung der Promotor-Aktivität bedingen. Dies hat wiederum eine Änderung der Proteinexpression zur Folge. Veränderungen in der GRK2- und GRK5-Expression können das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz bzw. deren Progression in entscheidendem Maße beeinflussen. Hohe Promotor-Aktivitäten, die zu einer vermehrten Expression der GRKs führen, würden in einer vermehrten Desensibilisierung von β -Rezeptoren resultieren. Eine dekompenzierte Herzinsuffizienz könnte schneller einsetzen. Sequenzvarianten des *GRK2*- und *GRK5*-Promotors, die deren Proteinexpression beeinflussen, könnten somit als prognostische Marker herangezogen werden. Um Rückschlüsse auf Änderungen der Genexpression der GRK2 und GRK5 ziehen zu können, ist es wichtig, deren Promotoren auf Sequenzvarianten zu untersuchen.

2.6.

Single nucleotide polymorphisms

Als SNP, also Einzel-Nukleotid-Polymorphismus, wird eine Position im Genom bezeichnet, an der alternativ zwei verschiedene Basen vorliegen. Der Unterschied zu einer Punktmutation besteht in der Häufigkeit des Auftretens dieses Basenaustausches. Diese liegt im Falle eines SNPs in der jeweiligen Population über 1 %. Bei einem Basenaustausch unter 1 % spricht man von einer Mutation. Außerdem sind SNPs stabil, d.h. sie ändern sich über mehrere Generationen kaum⁵⁰.

SNPs stellen die häufigste Variation des Genoms dar und treten ca. alle 1000 Basenpaare auf. Bisher wurde von ca. 4 Millionen SNPs im menschlichen Genom berichtet. SNPs machen etwa 90 % der Diversität der Menschheit aus und beeinflussen phänotypische Variationen zwischen den Menschen maßgeblich. So können bestimmte SNPs auch für Krankheiten prädisponieren⁵¹.

Ein großer Anteil besteht aus funktionslosen SNPs, welche als stumme SNPs (sSNP) bezeichnet werden. Andere SNPs haben eine funktionelle Bedeutung. So

beeinflussen regulatorische SNPs im Promotor (rSNP) die Expression, kodierende SNPs im Exon (cSNP) die Struktur eines Proteins und intronische SNPs (iSNP) das Spleißen. Da regulatorische Genregionen eine signifikante biologische Bedeutung haben, ist die Untersuchung von SNPs in diesem Bereich und die Feststellung des Zusammenhangs mit Krankheiten besonders wichtig⁵². Studien zeigen, dass SNPs in der Promotorregion häufiger in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes als in weiter aufwärts gelegenen Regionen vorkommen. Des Weiteren gibt es im Promotorbereich eine überproportional große Anzahl an Transversionen, d.h. eine Purinbase wird durch eine Pyrimidinbase substituiert und umgekehrt⁵³. Dies steht im Gegensatz zu einer Transition, die den Charakter der Nukleobase erhält. Dabei wird eine Purinbase (A, G) durch die andere Purinbase ersetzt, ebenso verhält es sich bei den Pyrimidinbasen (U/T, C). Außerdem ist die Anzahl der SNPs in einem Transkriptionsfaktor-Bindungsbereich höher als in einem Nicht-Bindungs-bereich. Auf Grund dessen, wird vermutet, dass SNPs im Promotorbereich über die Bindung eines Transkriptionsfaktors, die Genexpression beeinflussen können⁵³.

Außerdem ist die Frequenz mit der SNPs auftreten von großem Interesse. Dabei beschreibt das Kopplungsgleichgewicht in einer Population das theoretische Gleichgewicht der Allelkombinationen der unterschiedlichen SNPs. Bei freier Rekombinierbarkeit der SNPs und Kenntnis der Allelfrequenz kann das Kopplungsgleichgewicht berechnet werden. SNPs können abhängig voneinander vererbt werden, wenn sie sich auf denselben Chromosomen in derselben Region befinden. Je nach Abstand der SNPs besteht keine freie Rekombinierbarkeit. Daher tragen auch Selektion und genetischer Drift dazu bei, dass sich nicht das theoretisch erwartete Kopplungsgleichgewicht einstellt. Man spricht von einem Kopplungsungleichgewicht⁵⁴. Bei einem sehr starken Kopplungsungleichgewicht werden die SNPs häufig in einer bestimmten Kombination ihrer Allele vererbt. Diese bestimmte Kombination von Allelen wird als Haplotyp bezeichnet.

SNPs im Promotor stellen also eine mögliche Ursache für Unterschiede in der Genexpression dar. Sie bestimmen die Expression eines Gens auf transkriptioneller Ebene, nehmen Einfluss auf die Quantität der mRNA und somit auch auf die Quantität des translatierten Proteins.

Die Genexpression kann jedoch auch auf posttranskriptioneller Ebene beeinflusst werden, indem die Quantität der mRNA modifiziert wird. Dies geschieht durch kleinste RNA-Moleküle (miRNAs), die aufgrund ihrer geringen Größe sehr schnell synthetisiert werden können und so eine rasche Änderung der Genexpression erzielen. Sie stellen wichtige Genmodulatoren dar, die wie SNPs im Promotor eines Gens Einfluss auf die Genexpression haben. SNPs, welche eine posttranskriptionelle Genmodulation beeinflussen, befinden sich in der 3' UTR der mRNA. Sie können Bindungsstellen für miRNAs verändern und somit eine Bindung der miRNA verhindern oder zusätzliche Bindungsstellen schaffen. Beides resultiert in Veränderungen der Proteinexpression.

Studien zu einem Polymorphismus in der 3' UTR des Angiotensin 1-Rezeptors konnten bereits zeigen, dass eine negative Korrelation der Proteinexpression zur miR-155 besteht. Hier verändert ein SNP in der 3' UTR die Bindungsstelle für die miR-155. Hierdurch kommt eine komplementäre Bindung zwischen 3' UTR und miR-155 nicht zustande, so dass die Proteinexpression nicht negativ beeinflusst werden kann⁵⁵. Die Expression des Angiotensin 1-Rezeptors wird somit nur bei einer Sequenzvariante durch die miR-155 herunterreguliert. Bei Bestehen des Polymorphismus bleibt die Expression unbeeinflusst^{56,57}.

2.7.

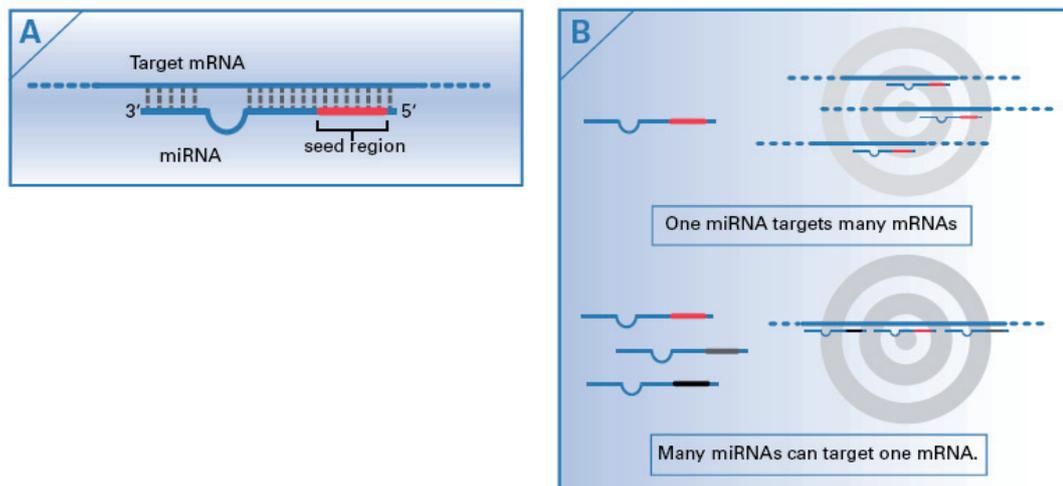
Funktion und Bedeutung von mikroRNAs

miRNAs sind kleine etwa 20 bp umfassende RNA-Moleküle, die nicht für Proteine kodieren, sondern sequenzspezifisch an mRNA binden und so die Proteinexpression bestimmter Gene (sog. Zielgene) beeinflussen. miRNAs sind eine neue Klasse von Genregulatoren auf posttranskriptioneller Ebene, die die endogene Proteinexpression, zum einen durch Degradierung der mRNA, zum anderen durch Inhibition der Translation negativ regulieren.

Man geht davon aus, dass etwa ein Drittel des gesamten Genoms durch miRNAs reguliert wird⁵⁸. Für die Bindung der miRNA an die mRNA ist zum einen der mole-

kulare Aufbau der miRNA und zum anderen die 3' UTR der mRNA, die als Bindungsstelle für die miRNA fungiert, von Bedeutung. miRNAs besitzen am 5'-Ende ihrer Sequenz eine sog. *seed*-Sequenz, die als Konsensussequenz, für die Bindung an die 3' UTR von entscheidender Bedeutung ist (→ Abb. 5, A). Eine miRNA:mRNA-Interaktion benötigt nur die 5 bis 8 bp große *seed*-Sequenz der miRNA, die komplementär zur Ziel mRNA sein muss, wobei die 3'-Region nur eine modulatorische Rolle zu spielen scheint⁵⁹. Die Konsensussequenz umfasst in ihrer Größe lediglich 5 bis 8 bp und ist somit der Grund dafür, dass miRNAs an eine Vielzahl von mRNAs binden können. Eine miRNA kann so bis zu 200 Zielgene regulieren⁶⁰. Andersherum kann eine Vielzahl von miRNAs an eine spezifische mRNA binden (→ Abb. 5, B). Ob es zu einer Degradierung, also zu einer Zerschneidung des Transkripts, oder zu einer Inhibierung der Translation an Ribosomen kommt, hängt vom Grad der Komplementarität der Bindung zwischen miRNA und mRNA ab.

→ Abb. 5:
Zielregionen und spezifische Bindung von mikroRNAs



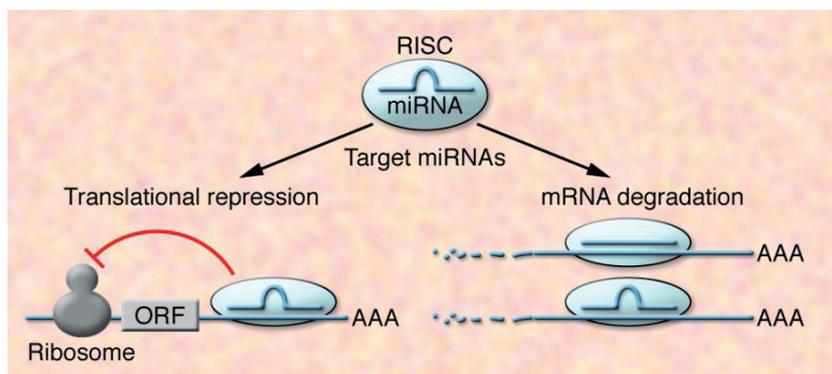
→ Abb. 5:
Zielregionen und spezifische Bindung von mikroRNAs,

A Darstellung der *seed*-Region einer mikroRNA, B (oben) einer mikroRNA ist es möglich an eine Vielzahl von Genen zu binden, gleichzeitig können viele mikroRNAs an die mRNA eines Gens binden, (unten), nach *mikroRNAs*:
Review of Discovery, Biogenesis, and Research Areas, Darmacon. Mit freundlicher Genehmigung von Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland.

Bei vollständiger Komplementarität zwischen miRNA und mRNA-Sequenz kommt es zu einer Degradierung der mRNA. Bei teilweiser Komplementarität wird lediglich die Translation an den Ribosomen verhindert (→ Abb. 6). In beiden Fällen wird die Expression des Proteins, für das die mRNA codiert, verhindert. Im Falle einer vollständiger Komplementarität bereits auf mRNA-Ebene, bei teilweiser Komplementarität auf Proteinebene.

→ Abb. 6:

Regulation der Proteinsynthese durch mikroRNAs



→ Abb. 6:

Regulation der Proteinsynthese durch mikroRNAs, über die translationale Repression (links) und die mRNA Degradierung (rechts), nach van Rooij, *Journal of Clinical Investigation*. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

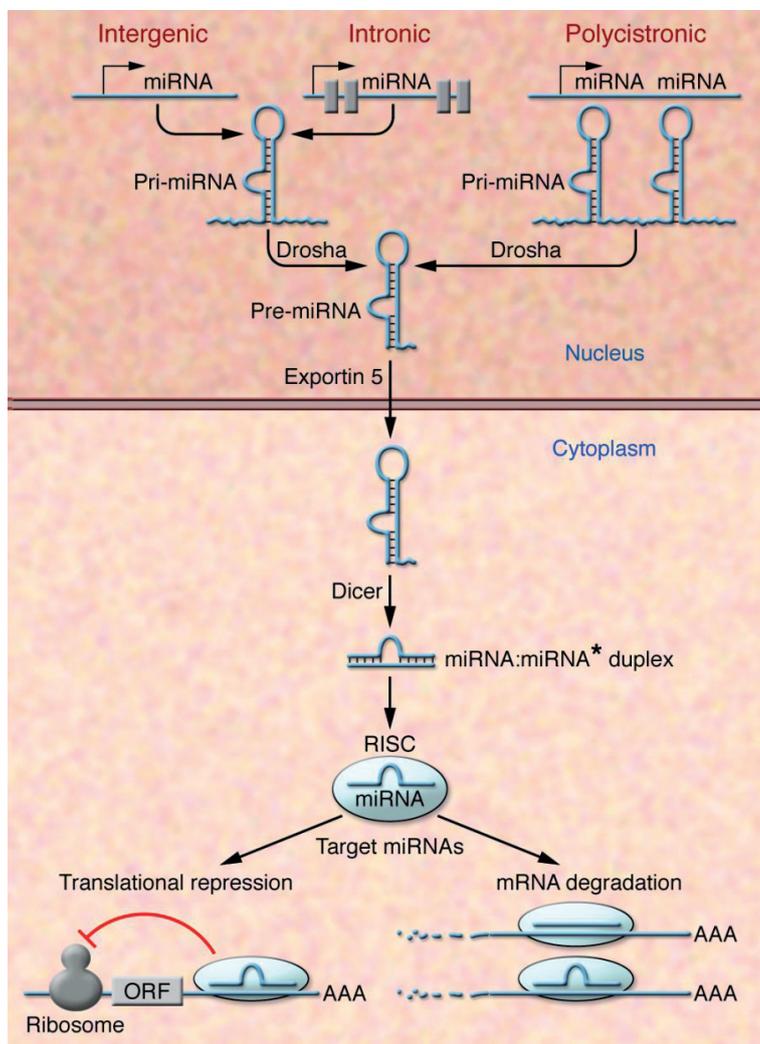
Um diese Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation erklären zu können, ist es wichtig, die Expressionswege der miRNAs und die Vorgänge, die daran beteiligt sind, genauer zu betrachten.

miRNAs werden zum einen über miRNA-kodierende Gene, zum anderen über Introns proteinkodierender Gene kodiert. Dies erfolgt zunächst im Nukleus, wo in einem ersten Schritt die sog. pri-miRNA als primäres Transkript transkribiert wird (→ Abb. 7). Sie besitzt zum einen eine spezifische 7mCap Struktur, die wichtig für die Anlagerung an die 3' UTR der Ziel mRNA ist, und zum anderen einen poly-A Schwanz, der entscheidend für die miRNA Stabilität ist. Die Synthese des eigentlichen miRNA Strangs erfolgt über zwei Endonuklease Reaktionen, wobei zwei Ribonukleasen Teile der pri-miRNA abspalten. Die erste Reaktion erfolgt im Nukleus über die Drosha-Ribonuklease, die die sog. pre-miRNA generiert. Diese wird über Exportin 5 ins Zyto-

plasma transportiert. Dort entsteht über den zweiten Endonuklease-Schritt durch die Dicer-Ribonuklease ein miRNA-Duplex von dem sich ein Strang, der die eigentliche miRNA darstellt, mit dem *RNA-induced-silencing-Complex* (RISC) zusammenlagert. Dieser Komplex bindet dann an die 3' UTR der mRNA. Es erfolgt je nach *matching* der Sequenzen, eine Degradierung der mRNA oder Inhibierung der Translation.

→ Abb. 7:

Expressionswege von mikroRNAs



→ Abb. 7:

Expressionswege von mikroRNAs, je nach genetischer Lokalisation der Sequenz im Genom sind mikroRNAs intergenetisch, intronisch oder polycistronisch lokalisiert, nach van, R. E. & Olson, E. N. *MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets*. *J. Clin. Invest* 117, 2369-2376 (2007).
Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

In diesem Zusammenhang spricht man von miRNAs als posttranskriptionelle Genmodulatoren⁶¹. Die Bedeutung von miRNAs für den Organismus wurde erstmals 1993 durch die Entdeckung eines nicht für Proteine codierenden RNA-Moleküls deutlich. Hier wurde die sog. lin-4 in Zellen von *C. elegans* als das LIN-14-Protein negativ-regulierende RNA Molekül entdeckt. Die lin-4 stellte sich somit als essentiell für die postembryonale Entwicklung von *C. elegans* dar^{62,63}.

In den folgenden Jahren konnten miRNAs mit verschiedenen onkologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden und werden als prognostische Marker diskutiert⁶⁴⁻⁶⁶. Aufgrund modifizierter miRNA-Expression unter pathologischen Verhältnissen können verschiedene Signalwege beeinflusst werden. Um die Bedeutung von miRNAs für verschiedene physiologische und pathologische Prozesse zu untersuchen, ist die Kenntnis ihrer Zielgene von essentieller Bedeutung. Es existiert daher eine Vielzahl von Algorithmen, die zur Vorhersage von Zielgenen jeder einzelnen miRNA eingesetzt werden. Zu den bekanntesten und am besten validierten zählen die *TargetScan Database*⁶⁷ und *miRanda*⁶⁸ (→ Abb. 8).

→ Abb. 8:

Verwendete Datenbanken zur Zielgenbestimmung für mikroRNAs mittels Algorithmen

<http://www.targetscan.org>/<http://www.microrna.org/>

<http://www.microrna.org/microrna/home.do>

<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/Sup>

<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>

<http://pictar.org/>

<http://miRNAMap.mbc.nctu.edu.tw>

Allerdings sind sich nahezu alle Autoren einig, dass nur eine experimentelle Validierung eine Aussage über die wahren bzw. biologisch relevanten Zielgene zulässt.

2.8.

mikroRNAs im kardiovaskulären System

Seit einigen Jahren wird auch der Einfluss spezifischer miRNAs auf pathologische Veränderungen am Herzen diskutiert⁶⁹⁻⁷². Eine Vielzahl von miRNAs wird gewebe-spezifisch exprimiert und besitzt gewebespezifische Aufgaben und Funktionen. Bis heute konnte eine kleine Anzahl von miRNAs als muskelspezifisch identifiziert werden. Es handelt sich hier um die miR-1- und miR-133-Familie sowie um die miR-208, bei der von einer ausschließlichen Expression im Herzen ausgegangen wird⁷². Aufgrund ihres vornehmlichen Auftretens in Muskelgewebe werden diese miRNAs auch als *Myomirs* bezeichnet.

Es konnte in den letzten Jahren in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen der miRNA-Expression und verschiedenen kardiovas-kulären Krankheitsbildern besteht. Abhängig von der miRNA-Expression konnten unterschiedliche Phänotypen bestimmter Krankheitsbilder beobachtet werden, andersherum zeigten sich in Abhängigkeit des Krankheitsbildes Veränderungen im miRNA-Expressionsmuster. Im Folgenden soll die Bedeutung dieser drei muskelspezifischen miRNAs genauer beschrieben werden.

Die miR-1 besitzt zunächst die höchst konservierte Sequenz bei Vertebraten^{73,74}. Die miR-1 Subfamilie besteht aus zwei identischen Transkripten, miR-1-1 und miR-1-2, die zusammen mit der miR-133a-1 und miR-133a-2 auf den Chromosomen 2 und 18 kodiert sind. Dies weist auf die Besonderheit der miR-1- und miR-133-Ex-pression hin. Beide Transkripte bilden eine bicistronische Einheit und werden von einem gemeinsamen Promotor über zwei Lokalisationen im Genom transkribiert. Dies geschieht in antisense Richtung, wobei spezifische *upstream enhancer* ledig-lich die Expression der miR-1 initiieren können und sog. *intragenic enhancer* die die Transkription beider miRNAs bewirken. Zudem befindet sich die Lokalisation beider miRNAs im Intron eines Gens, wodurch ihre eigentliche Expression in kei-ner Abhängigkeit zur Genexpression steht, in dessen Intron die miRNAs kodiert sind⁷⁵. In Säugerorganismen, wird die miR-1-Expression im Herzen über den *Serum response factor* (SRF) kontrolliert, wodurch muskelspezifische Gene aktiviert wer-

den, die die Zelldifferenzierung kontrollieren⁷⁶. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die miR-1 für die Inhibierung der Kardiomyozytenproliferation verantwortlich ist, indem sie den Transkriptionsfaktor Hand2, der die Ausbreitung von Kardiomyocyten fördert, inhibiert⁷⁷. Eine Überexpression der miR-1 im Mausmodell führte zur Entwicklung von dünnwandigen Ventrikeln, wohingegen ein miR-1-*Knockout*-Modell zu hypotropher Ventrikelwand und Septumdefekten führte⁶⁹. Des Weiteren zeigten Studien den Einfluss der miR-1 auf die Reizweiterleitung am Herzen. Der Transkriptionsfaktor *Irx5* stellt hier ein direktes Zielgen der miR-1 dar. Dieser inhibiert Kaliumkanäle im Herzen und ist somit von entscheidender Bedeutung für die kardiale Repolarisation. Eine vermehrte Expression der miR-1 führt somit zu einer verlangsamten Depolarisation durch indirekte Repression von Kaliumkanälen⁷⁸. Zudem wurde durch eine weitere Arbeit, die direkte Inhibierung von Kaliumkanälen und Connexin 43 durch die miR-1 belegt, was die Bedeutung der miR-1 für die Ausbildung und Progression einer Arrhythmie verdeutlicht⁷⁰. Interessanterweise konnte ein miR-1-*Knockdown* die Ausbildung einer Arrhythmie verhindern. Außerdem kommt der miR-1 eine wichtige Funktion bei der Apoptose zu. Hier induziert ein Anstieg der miR-1-Expression die Apoptose von ventrikulären Rattenzellen. Diese und weitere Studien konnten einen pro-apoptotischen Effekt der miR-1 validieren, wobei die Hitzeschock Proteine HSP60 und HSP70 als direkte Zielgene identifizieren ließen⁷⁹. Umgekehrt wurden anti-apoptotische Funktionen mit der miR-133 assoziiert, die die Kaspase 9 als direktes Zielgen reguliert. Die Funktion der miR-1 konnte also bis heute u.a. mit pro-apoptotischen Effekten und arrhythmischen Krankheitsbildern des Herzens in Verbindung gebracht werden.

Die miR-133-Familie besteht ebenfalls aus zwei homologen miR-133a-Elementen, miR-133a-1 und miR-133a-2, sowie aus der fast homologen miR-133b. Wie bereits angeführt, besteht die miR-133a aus zwei Transkripten, welche aus der bicistronischen Einheit mit der miRNA-1 transkribiert werden. Die miR-133b wird als separates Transkript exprimiert⁸⁰. Sowohl die miR-133a als auch die miR-133b sind sog. reife Formen, *mature Sequenzen*, der miR-133 Familie. Sie besitzen dieselbe Kernsequenz, die für die funktionellen Effekte auf die Ziel mRNA verantwortlich ist. Für die Expression der muskelspezifischen miR-133 konnten Zusammenhän-

ge zur kardialen Hypertrophie, Fibrose und zur Herzinsuffizienz gezeigt werden, also bei Prozessen, die mit *Remodeling* einhergehen^{80,81}. Untersuchungen am Mausmodell zeigten außerdem eine Herunterregulation der kardialen miRNA-133 nach Aortenligatur oder α -Vasokonstriktor-(Phenylephrin)-Behandlung. Eine Überexpression der miRNA-133a blockierte in kultivierten Kardiomyozyten die „hypertrophe Reaktion“ nach Behandlung mit Hypertrophie-induzierenden Agonisten⁷¹. Um die miR-133a-Funktion *In vivo* aufzuklären, infundierten Care et al.⁷¹ gegen miR-133a gerichtete Oligonukleotide (AntagomiRs). Die so behandelten Tiere entwickelten sowohl eine hypertrophe Kardiomyopathie als auch eine Herzinsuffizienz. Da eine reduzierte Expression im Tiermodell sowohl bei pathologischen (mechanisch bedingte Drucküberladung) als auch physiologischen (transgene Überexpression von Akt, Ausdauertraining) Reizen detektiert wurde, wird der miR-133 eine zentrale Rolle bei kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz zugesprochen. Kürzlich konnte zudem im Mausmodell gezeigt werden, dass verminderte kardiale miR-133-Expression mit kardialer Fibrose assoziiert ist⁸². Diese Beobachtung geht mit Ergebnissen aus Versuchen mit miR-133-*Knockout*-Mäusen einher. Diese Tiere entwickelten schwere Fibrose und Herzinsuffizienz, die in dilatativer Kardiomyopathie und plötzlichem Herztod mündeten⁸³. Jedoch zeigten diese Tiere keinerlei Zeichen einer kardialen Hypertrophie, obwohl, wie oben erwähnt, die Blockade der miR-133 durch Aktivierung von Hypertrophiegenen zu einer hypertrophen Kardiomyopathie mit verminderter kardialer Funktion führte. Dies steht im Gegensatz zu Versuchen an miR-133 *Knockout*-Mäusen, bei denen eine deutliche Fibrose ohne Hypertrophiezeichen detektiert wurde. Für die Herzhypertrophie stellt die miR-133 also eine komplexe Schlüsselrolle dar, die durch die Identifizierung der Zielgene RhoA und CDC42 (GTP-GDP Bindungsproteine, die bei der Regulation der Kontraktilität beteiligt sind) sowie WHSC42 (ein Zellkernprotein, welches das fetale Genprogramm in Kardiomyozyten induzieren kann)⁷¹ verifiziert wurde. Die Bedeutung der miR-133 für die kardiale Fibrose konnte kürzlich durch die Identifizierung des *connective tissue growth factor* (CTGF) als Zielgen der miR-133 bestätigt werden. Der CTGF stellt ein Schlüsselregulator bei der Kontrolle der extrazellulären Matrix dar. Eine niedrige miR-133-Expression ist somit mit einer direkten Steigerung der kardialen Fibrose assoziiert. Interessanterweise konnte zudem ein Zusammenhang der miR-133-Expression und der

Entwicklung einer Herzinsuffizienz detektiert werden. Hier konnte in einem miR-133 Doppel-*Knockout*-Mausmodell eine gesteigerte Expression von *serum response factor* (SRF) gezeigt werden⁸³. Diese Dysregulation des SRF führte zum Phänotyp der Herzinsuffizienz, da dieser Transkriptionsfaktor eine bedeutende Funktion für das kardiale *Remodeling* besitzt⁸⁴. Interessanterweise wird die miR-133-Expression durch SRF induziert⁷⁷. Somit kann von einem negativen Rückkopplungsmechanismus bei der SRF Regulation durch miR-133 ausgegangen werden. Die Progression einer Herzinsuffizienz geht zudem immer mit Apoptose einher. Wie eingangs erwähnt, zeigt die miR-133 im Gegensatz zur miR-1 eine protektive Funktion bei der induzierten Apoptose⁷⁹. Dies konnte anhand embryonaler Ratten-Kardiomyozyten gezeigt werden, wobei die Kaspase 9 als direktes Zielgen der miR-133 identifiziert wurde. Eine verminderte miR-133-Expression wurde mit gesteigerter Expression der Kaspase 9 und damit verbundener Apoptose assoziiert. Über die Bedeutung der miR-133 bei ischämisch bedingter Herzinsuffizienz in Folge einer KHK ist bislang nichts bekannt. Aufgrund der essentiellen Rolle am Herzen, ist aber vorstellbar, dass es durch eine ischämisch bedingte Herzinsuffizienz zu einer Dysregulation der miR-133 kommt.

Neueste Arbeiten konnten miRNAs in Serum und Plasma nachweisen und in Korrelation mit kardialen Erkrankungen bringen⁸⁵. Es wurde u.a. ein Anstieg muskelspezifischer miRNAs im peripheren Blutkreislauf bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt detektiert. Serumkonzentrationen der miR-1 und miR-133 zeigten sich sowohl bei Patienten mit Myokardinfarkt, als auch bei denen mit KHK erhöht. Im Herzgewebe selbst konnte dagegen eine niedrige Expression dieser miRNAs dargestellt werden. Die im Blutkreislauf zirkulierenden miRNAs befinden sich in Exosomen, die nach einer Ca²⁺ Stimulation freigesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die miR-133-Zirkulation im Blutkreislauf ein nicht invasiver Marker für den Zelltod von Kardiomyozyten ist⁸⁶.

Schließlich gehört die miR-208 zu den am Besten untersuchten miRNAs im kardiovaskulären System. Sie wird nur im Herzen exprimiert und ist im Intron 27 des *α-myosin heavy chain* (MHC)-Gen kodiert. Die Bedeutung der miR-208 wird in Zusammenhang mit der β-MHC-Regulation, also der Regulation der primären kontraktilen Proteine im Herzen, diskutiert. Hier konnte gezeigt werden, dass die

miR-208 die Regulation dieser Proteine unter kardialen Stressbedingungen kontrolliert⁷². Van Rooij et al.⁷² konnten eine Korrelation zwischen der pre-miR-208 und der Entwicklung einer idiopathischen Kardiomyopathie beobachten. Die *mature* Sequenz der miR-208 besitzt eine kürzere Halbwertszeit und konnte daher weniger gut detektiert werden. Ein *Knockout* der miR-208 im Mausmodell erzeugte eine vermehrte Expression schneller kontraktile Proteine sowie von Stress-Proteinen. Interessanterweise, stellen diese Proteine keine Zielgene der miR-208 dar, obwohl ein *Knockout* mit Hypertrophie und Fibrose assoziiert ist. Vielmehr wurde bei miR-208-*Knockout*-Tieren eine Hochregulation der Stress-Marker Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) und B-Typ Natriuretisches Peptid (BNP) am Herzen beobachtet. Jedoch konnten diese bisher nicht als Zielgene identifiziert werden. Des Weiteren wurde in der bereits erwähnten Arbeit herausgestellt, dass Stress-Stimuli eine Reduktion der α -MHC-Transkription zur Folge hat und somit die miR-208-Expression negativ beeinflusst. Die miR-208 besitzt eine wesentliche Funktion bei der Reaktion des kardialen *Remodelings* auf spezifische Stress-Signale.

2.9.

Pathologisch veränderte Herz-Kreislaufparameter bei ACVB-Patienten

Bei Patienten, die sich einer koronaren Bypass-Operation unterziehen müssen, ist die Sauerstoffzufuhr am Herzen gestört. Dabei besteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf, was unweigerlich zu einer mehr Zirkulation oder minder ausgeprägten Ischämie bzw. Koronarinsuffizienz am Herzen führt. In den meisten Fällen entstehen ischämische Zustände durch Verlegung der Koronargefäße in Folge einer Arteriosklerose. Die möglichen Folgen einer Koronaren Herzerkrankung (KHK) sind u.a. die Herzinsuffizienz und der plötzliche Herztod. Die KHK ist eine chronische Erkrankung, die im Verlauf von Jahren bis Jahrzehnten fortschreitet. Sie ist in ihrer akuten Manifestation die häufigste Todesursache der Bevölkerung in den Industrienationen^{87,88}.

Je nach Schwere und Verlauf der Erkrankung befinden sich die Patienten in unterschiedlichen Stadien der Herzinsuffizienz und zeigen mehr oder minder veränderte Abweichungen klinischer Herz-Kreislaufparameter. Parameter, mit denen sich

eine Herzinsuffizienz quantifizieren lassen, sind zum einen Parameter der invasiv gemessenen Hämodynamik (PAP, PCWP), der labordiagnostisch erfasste NT-proBNP Spiegel und die anamnestisch erhobene NYHA-Klassifizierung.

Intraoperativ kann bei einer ACVB-Operation die Hämodynamik invasiv quantifiziert werden. Bei ACVB-Operationen wird zur Kreislaufüberwachung häufig ein Pulmonalkatheter (Swan-Ganz-Katheter) eingesetzt. Dieser Katheter wird in die Vena subclavia oder Vena jugularis interna eingebracht und kann als Instrument zur Überwachung der kardiovaskulären Funktion eingesetzt werden. Nach Aufblasen des endständigen Ballons wird er über das rechte Herz bis in einen Ast der Arteria pulmonalis eingeschwenkt. Verschließt der Ballon einen Ast der Arteria pulmonalis wird die sog. Wedge-Position erreicht. Der pulmonalkapilläre Verschlussdruck (PCWP) oder Wedge-Druck, entspricht dabei dem linken Vorhofdruck. Zusätzlich kann der Pulmonalarterielle Mitteldruck (PAP) gemessen werden. Durch die Messung dieser Parameter, kann die Herzfunktion beurteilt werden^{89,90}. Der PCWP stellt einen wichtigen Marker für die Beurteilung der kardialen Funktion dar. Messungen des PCWP bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung oder einer kardialen Hypertrophie, ergaben Werte bis zu 48mmHg. Ein PCWP von 5 bis 12 mmHg, ist als physiologisch zu beurteilen. Der physiologische PAP liegt bei 9 bis 16 mmHg⁹⁰. Ein Anstieg dieser Drücke geht mit einer Drucküberbelastung des linken Herzens einher, wobei ein erhöhter PAP ebenfalls durch einen Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes, wie etwa bei einer pulmonalen Hypertension bedingt sein kann.

Eine weitere validierte Messmethode zur Einteilung der Herzinsuffizienz ist die NT-proBNP-Konzentration im Blut. Aus der Familie der natriuretischen Peptide werden das BNP und dessen Vorstufe das NT-proBNP als diagnostische Marker der Herzinsuffizienz herangezogen. BNP ist ein Neurohormon, welches bei erhöhter Wandspannung durch Volumen- und Drucküberlastung aus dem rechten und linken Ventrikel freigesetzt wird^{91,92}. Es ist bei symptomatischer linksventrikulärer Dysfunktion erhöht und korreliert mit dem Schweregrad der Symptome und der Prognose. Daher wird das BNP als quantitativer Herzinsuffizienzmarker herangezogen. Je schwerer die Herzinsuffizienz, desto höher das BNP und NT-proBNP. Eine Studie konnte zeigen, dass Patienten mit einer dekompensierten Herzinsuffizienz und einem BNP von über 350 pg/ml ein um den Faktor 5 erhöhtes Risi-

ko haben, an der Erkrankung zu sterben. Bei Patienten mit einem BNP von über 700 pg/ml ist das Risiko sogar um den Faktor 15 erhöht⁹³. Bei BNP Werten unter 300 pg/ml ist die Ausbildung einer Herzinsuffizienz als eher unwahrscheinlich anzusehen, bei Werten zwischen 300–1800 pg/ml ist sie als intermediär einzustufen und im Falle von Werten über 1800 pg/ml sehr wahrscheinlich⁹¹⁻⁹⁵. Die eigentliche Funktion des BNP liegt in der Steigerung der Diurese und der peripheren Gefäßdilatation, um Volumen- und Druckbelastung am Herzen entgegen zu wirken. Dabei entspricht die BNP-Konzentration der seiner Vorstufe dem NT-proBNP⁹⁶.

Ein klinischer Parameter zur Beurteilung der Herzinsuffizienz, ist die anamnestisch erhobene NYHA-Klassifizierung. Die NYHA-Klassifizierung entspricht der Einteilung der erfassten Symptome einer Herzinsuffizienz und wurde ursprünglich von der *New York Heart Association* als Schema zur Einteilung von Herzerkrankungen veröffentlicht (→ Tab. 3).

→ Tab. 3:

NYHA-Klassifizierung nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

Stadium	Definition
NYHA I	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht · keine inadäquate Erschöpfung, · keine Rhythmusstörungen, · keine Luftnot oder Angina pectoris.
NYHA II	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.
NYHA III	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris
NYHA IV	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.

Am häufigsten wird sie zur Einteilung der Herzinsuffizienz in verschiedene Stadien, entsprechend der Leistungsfähigkeit des Patienten verwendet, und lässt Rückschlüsse auf das Ausmaß der Herzinsuffizienz zu. Die NYHA-Klassifizierung liefert keine Hinweise auf die Ursache der kardialen Störung. Die zur Beurteilung der Stadien herangezogenen Symptome beinhalten Dyspnoe, Nykturie, Zyanose, allgemeine Schwäche, Müdigkeit, Angina Pectoris oder kalte Extremitäten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1.

Material

3.1.1.

Geräte

Analysenwaage	: Satorius, Göttingen	Real Time PCR System	: Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Autoklav	: Fedegari, Albuzzano, Italien	Schüttler	: Janke + Kunkel, Staufen
Blottkammer	: BioRad, München	Spektrophotometer	: Peqlab, Erlangen
Brutschränke	: Cellstar, Queue, Memmert, Schwabach	Sterilbank	: MDH, Heraeus, Buck- ingham Shire, England
Coultercounter	: Beckmann, LS6000IC, Krefeld	Thermocycler	: Biometra (Uno, UnoII, TGradient), Göttingen
Feinwaage	: Denver Instrument, Göttingen	Thermomixer	: Eppendorf, Hamburg
Flüssigkeitsszintillations- detektor	: GMI, Ramsey, USA	Thermo Sealer	: Thermo Sientific, München
Gelelektrophorese- kammern (Horizontalgele)	: Eigenbau	Ultra-Turrax	: Janke + Kunkel, Staufen
Geldokumentation	: Intas, Göttingen	UV-Crosslinker	: Stratagene, Frankfurt am Main
Grobwaage	: Satorius, Göttingen	Vortex Gerät	: Heidolph, Schwabach, Oehmen, Essen
Heizblöcke	: HLC, Reinach, Schweiz	Wasserbad	: Julabo, Köttermann, Seelbach
Inkubationsschüttler	: New Brunswick Scientific, Edison USA	Zellzähler	: Schärfe, Reutlingen
Laufkammer (Vertikalgele)	: Hoefler	Zentrifugen	: Megafuge 1.0R; (Heraeus), Bucking- ham Shire, England, Omnifuge 2.0 RS (Heraeus), Bucking- ham Shire, England, Biofuge pico A bzw. 13 (Heraeus), Bucking- ham Shire, England, Centrifuge 5417 C (Eppendorf), Hamburg
Luminometer	: Berthold, Hamburg		
Magnetrührer	: Heidolph, Schwabach		
Mikroskop	: Nikon, Düsseldorf		
Mikrowelle	: Lunik		
Netzgeräte	: LKB, Pharmacia		
pH-Meter	: Metrohm, Filderstadt		
Pipetten	: Labsystems, Australien Finnpipette (0.5-10, 5-40, 20-200, 200-1000)		
Plattenluminometer	: Berthold, Hamburg		
Pyrosequenzierer	: Biotage, Uppsala		

3.1.2.

Verbrauchsmaterial

Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Boehringer (Ingelheim, Deutschland), Difco (Heidelberg, Deutschland), Fluka (München, Deutschland), Gibco-BRL (Darmstadt, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma (München, Deutschland) bezogen.

Enzyme

Die eingesetzten Enzyme stammen von den Firmen New England Biolabs (Ipswich, USA) und MBI-Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

PCR-Primer

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland) und Invitrogen (Darmstadt, Deutschland).

3.1.3.

Medien

Die Medien und Zusätze für verwendete Zelllinien wurden von PAA Laboratories (Pasching, Austria) und Invitrogen (Cascade Biologics, Portland, USA) bezogen und mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert.

Medium für HEK293- und A10-Zellen

Dulbecco 's Modified Eagle Medium (DMEM), *high Glucose* mit *L-Glutamine* (500 ml)
+ 0,1 ml / ml Fötale Kälberserum
+ 100 U / ml Penicillin
+ 100 µl / ml Streptomycin

Medium für HASM-Zellen

Medium 231 (500 ml)

+ 25 ml *Smooth Muscle Growth Supplement*

Bakterienmedium flüssig

Hefeextrakt 5 g

NaCl 8 g

Tryptan 10 g

ad 1 L H₂O bidest.

Die Dampfsterilisation erfolgte für 20 min bei 120 °C und 1,4 bar im Autoklaven.

Bakterienmedium fest

Zur Herstellung des Festmediums für Bakterien wurde dem flüssigen Bakterienmedium vor dem Autoklavieren 15 g Agar-Agar zugegeben und nach Abkühlung auf 60 °C 500 ng/ml Ampicillin.

Bakterienmedium zur Selektion

Dazu wurde das flüssige Bakterienmedium nach dem Autoklavieren und Abkühlung auf 60 °C mit 40 mg/ml Xgal und 500 ng/ml Ampicillin versetzt.

3.1.4.

Biologisches Material

DNA zur Untersuchung des GRK 2-(inkl. cDNA) und GRK 5-Gens auf SNPs und deren Verteilung in verschiedenen Ethnien

Kaukasier:

Das eingesetzte DNA Material stammte von 615 gesunden Blutspendern aus Essen¹⁴¹.

Afrikaner:

Die DNA wurde aus Blut von 355 gesunden Blutspendern des Stammes Shona aus Harare (Zimbabwe) isoliert¹⁴¹.

Asiaten:

Es wurde DNA Material von 305 männlichen Blutspendern aus der Provinz Buhan (China) untersucht¹⁴¹.

cDNA:

Zur Untersuchung der cDNA wurde zunächst RNA aus Gewebe des rechten Vorhofes von Bypass-Patienten isoliert und in einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Es wurden 10 Proben auf SNPs untersucht.

DNA für Assoziationsstudien zu den SNPs im *GRK2*- und *GRK5*-Gen und mikroRNA-Expression

Herzohr-(HO-) Proben:

Für Assoziationsstudien zu miRNA- und Gen-Expression wurde Blut von Patienten präoperativ gewonnen und anschließend dessen DNA isoliert. Es wurden 150 Proben untersucht.

Isolierung von mikroRNA zur Untersuchung der miR-1-, miR-133a/b- und miR-208-Expression in Herzgewebe

Das gesamte verwendete miRNA-Material stammt aus Gewebe des rechten Vorhofes von 83 Patienten sowie aus Leber-, Nieren-, Skelettmuskel- und Aortengewebe der Ratte. Ebenso wurde RNA aus den Zelllinien A10, HASM, HEK293, und Hela gewonnen.

Zelllinien

Verwendete Zelllinien stammten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) sowie von der Firma Invitrogen (Cascade Biologics, Portland, USA).

A10-Zellen:

A10-Zellen stellen glatte Muskelzellen aus der Aorta der Ratte dar und wurden erstmalig 1976 in der thorakalen Aorta einer DB1X embryonalen Ratte nachgewiesen. Sie sind für die Darstellung typischer Eigenschaften der glatten Muskelzelle von Bedeutung¹⁴². In der stationären Wachstumsphase zeigen A10-Zellen spontane Aktionspotentiale und gesteigerte Aktivität der Myokinase und Kreatinphosphokinase. Neben Myosin stellen diese Enzyme die hauptsächlichen zellulären Produkte dar. Morphologisch stellen sich die A10-Zellen als myoblastär dar, die sowohl epitheliale als auch fibroblastenähnliche Charakteristika zeigen. Es sind adhärente Zellen, die in Monolayern wachsen.

HEK293-Zellen:

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen. Nachgewiesen wurden diese Zellen in einer menschlichen mit Adenovirus Typ 5 transformierten Urniere¹⁴³. Morphologisch stellen sich HEK293-Zellen als fibroblastische Zellen dar, die adhärend in Monolayern wachsen.

HASM-Zellen:

HASM-Zellen sind glatte Muskelzellen aus der humanen Aorta. Sie stellen sich als spindelförmige, adhärente, in Monolayern wachsende Zellen dar.

Plasmide

Klonierungsvektor für GRK2- und GRK5-Promotor- und 3'UTR-Konstrukte:

pGEMT-easy (Promega, Mannheim, Deutschland) ist ein etwa 3 kb großer, linearisierter Klonierungsvektor. Dieser besitzt sog. 3' T-Überhänge an der Insertionsstelle, welche für die Ligation des PCR-Produktes sorgen und gleichzeitig eine Vektor-Rezirkulation verhindern. Bei der Ligation lagern sich die 3' T-Überhänge des Vektors mit den durch die Taq-Polymerase an das amplifizierte PCR-Produkt angehängte Desoxyadenosine zusammen. In der *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors befindet sich die α -Peptid codierende Region des β -Galaktosidase Enzyms, welches bei der Ligation des PCR-Produktes in die MCS des Vektors inaktiviert wird. Rekombinierte Klone können so auf Indikatorplatten (Xgal Zusatz) durch Farbumschlag sichtbar gemacht werden.

Reportervektor für GRK2- und GRK5- Promotorkonstrukte:

Der pGl4.10-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) ist ein etwa 4,2 kb großer Reportervektor, der zur Messung der Genexpression in Säugerzellen optimiert wurde. Er besitzt ein sog. luc2-Gen (*Photinus pyralis*), dessen Aktivität bei der Expressionsmessung detektiert wird. Zusätzlich besitzt er ein β -Laktamase bzw. Amp-Gen, welches die Bindung von Transkriptionsfaktoren an das luc2-Gen reduziert und so die Hintergrundaktivität bei der Messung verringert. So wird eine abnormale Transkription des luc2-Gens verhindert.

Reportervektor für die 3'UTR des GRK 2-Gens:

Der *pMIR-Report Luciferase*-Vektor (Ambion, Darmstadt, Deutschland) ist ein spezifischer Vektor zur Klonierung und Untersuchung potentieller miRNA-Bindungsstellen. Der etwa 6,5 kb große Vektor besitzt ein Firefly-Luciferasegen, welchem ein Cytomegalie-Virus (CMV)-Promotor vorgeschaltet ist. Dieser ist für eine besonders hohe Expression des Firefly-Luciferasegens verantwortlich. Dieses Vektorsystem ist u.a. konstruiert, um bei der Transfektion des Konstrukts in Säugerzellen die endogene miRNA-Expression zu beurteilen. Dies ist möglich, indem die 3'UTR des Gens in die MCS des Vektors kloniert wird, die dem Luciferasegen nachgeschaltet ist. Bei der Bindung von miRNA an die 3'UTR wird die Expression der Luciferase reduziert.

Reportervektor zur Normierung der Transfektionsquantität:

Hierzu wurde der pGl4.73 (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet, der für ein Renilla-Luciferasegen kodiert. Dieser Vektor wurde im *Dual Glo Luciferase Assay* (Promega, Mannheim, Deutschland) zusammen mit dem jeweiligen Reportervektor transfiziert. Über eine Dividierung der transfizierten Vektoren wurden so die Schwankungen in der Transfektionsquantität normiert, worauf im Abschnitt *Dual Glo Luciferase Assay* genauer eingegangen wird. Zur Normierung bei Stimulationsversuchen wurde der pGl4.74 Vektor verwendet, da diverse Stimulantien eine Reduzierung der SV40 Promotor-Aktivität des pGl4.73 verursachen und so die Stimulation falsch negativ beeinflusst worden wäre.

Reportervektor zur Feststellung der Transfektionseffizienz:

Der pEGFP-C1 (Promega, Mannheim, Deutschland) codiert für eine red-shifted Variante vom Wildtyp GFP. Die der MCS nachgeschaltete Sequenz kodiert für die Expression des *Enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Die Insertion von Promotorsequenzen in die MCS ermöglicht die Expression von EGFP. EGFP wird durch blaues Licht angeregt (Anregungsmaximum: 488nm) und fluoresziert grün (Emissionsmaximum: 507nm). Somit kann bei erfolgreicher Transfektion die Transfektionseffizienz durch Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Bakterienstämme

Bakterienstamm zur Klonierung von GRK2- und GRK5-Konstrukten:

E.coli DH5 α (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), Genotyp:
F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(rK⁻,mK⁺)
phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1

Bakterienstamm zur Mutagenese von GRK5-Konstrukten:

XL10-Gold[®] Ultracompetent Cells (Stratagene, Darmstadt, Deutschland), Genotyp:
TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' *proAB lacIqZDM15 Tn10* (Tetr) Amy Camr].

Herzgewebe zur Untersuchung der mikroRNA-Expression

Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis zur Studie erklärt, die durch die hiesige Ethikkommission genehmigt wurde.

HO-Gewebe (rechtes Atrium):

Zur Untersuchung der miRNA-Expression in Herzgewebe wurde von 83 Patienten Gewebe des rechten Vorhofes gewonnen. Gewebe des rechten Vorhofmyokard stammte von Patienten, die sich aufgrund einer koronaren arteriellen Herzerkrankung einer Bypass-Operation unterziehen mussten. Überschüssiges Vorhofmyokard wurde bei Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine gewonnen. Unmittelbar nach der Excision wurden die Proben in kohlenstoffhaltige (95 % O₂, 5 % CO₂) Tyrode-Lösung (mmol/l: NaCl 119.8; KCl 5.4; CaCl₂ 1.8; mgSO₄ 1.05; NaH₂PO₄ 0.42; NaHCO₃ 23.6; Glukose 5.05; EDTA 0.05; Ascorbinsäure 0.28) überführt und in flüssigen Stickstoff gegeben. Die spätere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Plasmagewinnung von ACVB-Patienten zur Bestimmung des NT-proBNP

Zur Bestimmung der NT-proBNP-Konzentration im Plasma von ACVB-Patienten wurde 24 Stunden prä-operationem EDTA-Vollblut entnommen und die NT-proBNP-Konzentration aus dem Serum bestimmt (Roche, Mannheim, Deutschland).

3.2.

Methoden

Soweit nicht anders angegeben, stammen die hier dargestellten Methoden aus dem Buch *Molecular Cloning: A laboratory manual*¹⁴⁴.

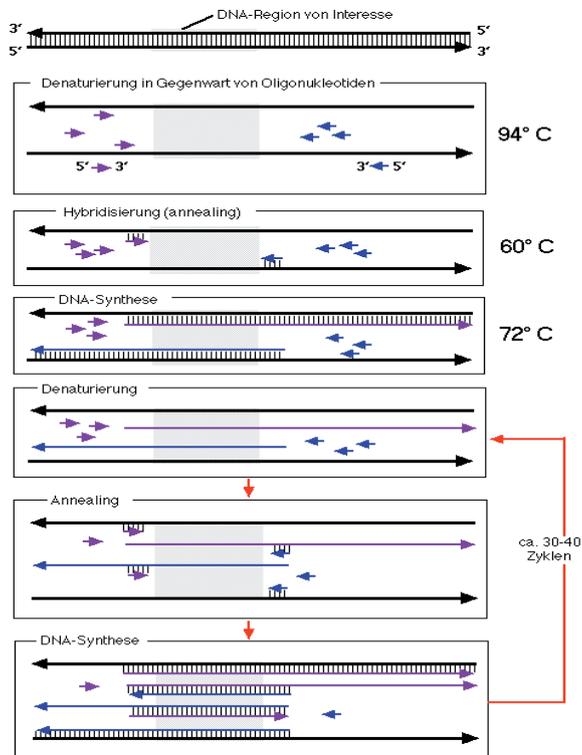
3.2.1.

Polymerase Chain Reaction

Die PCR-Reaktion ermöglicht in einem sich vielfach wiederholenden Prozess die selektive Vervielfältigung spezifischer Genabschnitte. Diese Reaktion ist nur mittels hitzestabiler DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien möglich. Hitzestabile DNA-Polymerasen, die auch nach wiederholtem Erhitzen auf 94 °C aktiv bleiben, sind z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder die Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Als Matrize können u.a. chromosomale DNA oder isolierte Plasmid-DNA dienen. Die Amplifizierung des Genabschnitts erfolgt durch ein spezifisches Primerpaar, welches in großem Überschuss vorhanden ist und den gewünschten Genabschnitt an einem der beiden DNA-Stränge flankiert.

Die Reaktion beginnt mit der *Denaturierung* (→ Abb. 9). Dabei wird der DNA-Doppelstrang auf 94 °C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden und schließlich Einzelstrang-DNA (ssDNA) vorliegt. Bei dem anschließenden *Annealing*, erfolgt eine Temperatursenkung auf 50 bis 60 °C. Die genomische DNA liegt dabei in zu geringer Konzentration vor, als dass die komplementären Stränge während der Inkubationsdauer aufeinander treffen könnten. Sie bleibt also denaturiert. Die herabgesetzte Temperatur führt zu einer Anlagerung der Primer an deren komplementäre Sequenz der ssDNA. An dieser Stelle der Sequenz erfolgt die Neu-Synthese eines DNA-Stranges. Dieser Vorgang wird als *Elongation* bezeichnet. Ein Temperaturanstieg auf 72 °C bedingt, dass die thermostabilen Polymerasen die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz an den 3'-OH-Enden verlängern können. Die Elongationszeit beträgt ca. 1 min pro kb. Nach Abschluß der Elongation wird erneut auf 95 °C erhitzt, um die neu gebildeten DNA-Doppelstränge zu denaturieren und die Reaktion läuft mit der Denaturierung abermals ab. In jedem wird die Anzahl der Kopien der DNA Sequenz verdoppelt, was zu einem exponentiellen Anstieg der gewünschten Sequenz führt.

→ Abb. 9:
Prinzip einer PCR-Reaktion



→ Abb. 9:

Prinzip einer PCR-Reaktion Die Denaturierung erfolgt bei 95°C wobei sich die beiden komplementären Stränge trennen. Anschließend wird beim Annealing die Temperatur auf 60°C herabgesetzt, wobei sich die Primer mit der DNA verbinden. Die Elongation erfordert eine Temperaturerhöhung von 72°C , so dass die Taq-Polymerase weitere komplementäre Nukleotide anlagern kann. So entstehen zwei partiell doppelsträngige DNA-Moleküle mit der Sequenz zwischen den beiden Primern. Während jedes Zyklus vermehrt sich die Anzahl kopierter DNA-Moleküle um den Faktor 2.

Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Ulrich Frey

Folgende Grundsätze sollten für die Etablierung einer PCR berücksichtigt werden

Primer:

Bei der Auswahl der Primer sollten folgende Merkmale beachtet werden:

- GC-Gehalt ca. 50 %
- ideale Länge 18 bis 28 bp; längere Primer müssen HPLC-gereinigt werden
- palindromische Sequenzen vermeiden
- Homologien der Primer zueinander vermeiden
- G oder C am $3'$ -OH-Ende zur Stabilisierung des in der PCR-Reaktion entstehenden Hybrids, längere GC-Abfolgen vermeiden

Annealing-Temperatur :

Die *Annealing*-Temperatur (T_m) der Primer kann anhand folgender Faustregel errechnet werden: $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A + T) + 4^\circ\text{C} \times (G + C)$

Die optimale *Annealing*-Temperatur liegt unter dem niedrigsten errechneten Schmelzpunkt. Diese Faustregel gilt allerdings nur für Primer mit ca. 18 bis 24 bp. Falls unspezifische PCR-Produkte gebildet werden, sollte die *Annealing*-Temperatur erhöht werden. Eine Senkung der *Annealing*-Temperatur kann durch den Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) erreicht werden.

PCR zur Untersuchung der jeweiligen Genabschnitte auf SNPs

Der PCR-Ansatz und die Temperatureinstellungen für den Thermocycler sind für die jeweiligen Genabschnitte bis auf angegebene Ausnahmen identisch. Die *Annealing*-Temperatur (T_m). Diese ist für die spezifischen Primer der Tabelle im Anhang zu entnehmen. Die Elongationszeit richtete sich nach der jeweiligen Größe des Genabschnitts.

PCR Ansatz:Thermocycler:

25 µl Master Mix (Amplicon)	95 °C – 3 min	
2 µl Sense Primer	35 × {	
2 µl Antisense Primer		95 °C – 30 sec
19 µl Aqua dest.		T_m – 40 sec
2 µl DNA	72 °C – 60 sec / kb	
	72 °C – 10 min	
	10 °C – 20 std	

Bei PCR-Ansätzen zur Amplifizierung von cDNA wurden je 2,5 µl von 1:10 bzw. 1:5 verdünntem cDNA-Material eingesetzt. Zur Amplifizierung von DNA für den Einsatz in der Pyrosequenzierung wurde die Anzahl der Zyklen auf 40 erhöht.

PCR zur Herstellung von GRK2- und GRK5-Promotor- und 3'UTR-Konstrukten

Sense und Antisense Primer für die jeweiligen Genabschnitte sind im Anhang unter „Primer zur Klonierung“ verzeichnet.

PCR Ansatz:

5,0 µl Pfu-Puffer + mgSO₄
1,0 µl dNTP Mix
2,0 µl Sense Primer
0,5 µl Pfu Polymerase (5U/µl)
37,5 µl Aqua dest.
2,0 µl DNA

Thermocycler:

95 °C – 3 min
35 × { 95 °C – 30 sec
T_m – 40 sec
72 °C – 120 sec/kb
72 °C – 10 min
10 °C – 20 std

Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte streng nach dem Protokoll *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland).

3.2.2.

Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung dient dazu spezifische DNA-Abschnitte zu sequenzieren, um so Genotypen von Interesse zu ermitteln. Bei der Reaktion wird das bei der DNA-Synthese gebildete Pyrophosphat detektiert, wodurch die Pyrosequenzierung nach dem Prinzip „Sequenzierung durch Synthese“ funktioniert. Bei dem Sequenziervorgang werden dem Reaktionsansatz die einzelnen Nukleotide nacheinander zugegeben. Der Sequenzierstrang wird mittels DNA-Polymerase verlängert, in dem sie die Bindung mit dem komplementären dNTP katalysiert. Bei

der Anlagerung der Nukleotide wird eine äquimolare Menge von anorganischem Pyrophosphat frei. Das freiwerdende Pyrophosphat (PPi) wird anschließend enzymatisch durch die ATP-Sulfurylase mit APS (Ammoniumpersulfat) zu ATP umgeformt.

Das so entstehende ATP dient dann wiederum als Energielieferant für die Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, was durch die Luciferase katalysiert wird. Bei diesem Schritt wird detektierbares Licht freigesetzt, dessen Betrag in linearer Beziehung zur Menge an gebildetem Pyrophosphat und somit zur Anzahl der eingebauten dNTPs steht. Da die vier dNTPs einzeln zugegeben werden, ist die Zuordnung des Lichtsignals zu einem dNTP möglich und damit die Ermittlung der zugrunde liegenden Sequenz. Das Nukleotid dATP dient der Luciferase als Substrat, was zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte, daher wird anstelle von dATP Deoxyadenosin- α -Thiodtriphosphat (ATP α S) verwendet. Das Enzym Apyrase baut nicht eingebaute dNTPs zu dNMPs ab. Dadurch werden Waschschrte zwischen den einzelnen Nukleotidzugaben überflüssig. Die Lichtemission wird aufgezeichnet und ist in einem Pyrogramm[™] als Peak erkennbar. Über die Peak-Höhe sind hier auch quantitative Aussagen der Laserauslesung möglich, wodurch bei der Pyrosequenzierung die Unterscheidung von SNPs in Homozygote und Heterozygote möglich wird. Dabei dient der biotinylierte Primer als komplementäre Vorlage zur Anlagerung des Sequenzierprimers. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der SQA-Software (*Pyrosequencing AB*). SNPs, die mittels Pyrosequenzierung untersucht wurden, sowie die dafür generierten Primer sind im Anhang unter „Primer zur Sequenzierung“ aufgeführt.

3.2.3.

Arbeiten mit DNA

DNA Präparation aus Blut

Für die Gewinnung genomischer DNA aus Blut wurde das *QIAmp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Präparation erfolgte streng nach Protokoll des Herstellers, *Blood and Body Fluid Spin Protocol* aus *QIAmp DNA Mini Kit and QIAmp DNA Blood Mini Kit Handbook* (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA und DNA-Fragmenten diente die horizontale Agarosegelelektrophorese. DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrates zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist wegen des Widerstandes der Agarose-Gelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Zum Vergleich der DNA-Größen verwendet man standardisierte Größenmarker (z.B. pBR322 DNA / *AluI*). Für DNA-Fragmente bis zu einer minimalen Größe von 1000 bp werden 1 %-Agarose-Gele verwendet, für kleinere Fragmente 2,5 %-Agarose-Gele. Zur Herstellung der Gele wird Agarosepulver mit TBE aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Anschließend werden 10 ml *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) 1:10 verdünnt pro 100 ml hinzugefügt. Es handelt sich hierbei um einen Cyanin-Farbstoff, der sich in die DNA-Doppelhelix einlagert und so DNA im UV-Licht sichtbar macht. Die Agaroselösung wird in abgedichtete Gelschlitten gegossen und ein Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation bei Raumtemperatur wird der Gelschlitten in die TBE gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt. Die Taschen werden mit den DNA-Proben gefüllt. Dabei richtet sich die Menge der eingesetzten DNA nach der Konzentration und der Größe des

Fragmentes. Von 2 μ l im 20 μ l Ansatz verdauter Miniprep DNA mit einer Plasmidlänge von 5000 bp werden beispielsweise 4 μ l Verdau-Lösung plus 0.8 μ l 6 \times Puffer eingesetzt. Eine Tasche wird mit Längenmarker (5 μ l) beladen. Die DNA wird anschließend bei konstanter Spannung (12 V/cm Gellänge) aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert.

- 1 \times TBE $\left\{ \begin{array}{l} 10,8 \text{ g Tris-HCl; } 5,5 \text{ g Borsäure;} \\ 0,744 \text{ g EDTA-Na; ad 1l H}_2\text{O bidest.} \\ 25 \% \text{ (w/v) Ficol; } 0,5 \% \text{ (w/v) Orangel} \end{array} \right.$
- 10 \times DNA Probenpuffer
- SYBR® *Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

Extraktion von DNA aus einem Agarose-Gel

Diese Methode dient der Extraktion von DNA-Fragmenten wie z.B. Vektoren oder klonierter DNA-Abschnitte (Inserts) aus einem Agarose-Gel. Die unter der UV-Lampe sichtbar gemachten DNA-Fragmente können nach Kontrolle der spezifischen Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Die Extraktion erfolgt durch Erwärmung des Gelstückes auf 50 °C. Die weiteren Extraktionsschritte sowie die Eluierung der DNA erfolgten nach Angaben des Herstellers mittels *QIAquick Gel Extraktion Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland), wobei exakt nach Protokoll vorgegangen wurde.

Restriktionsverdau von DNA

Bei dieser Methode werden Typ II-Restriktionsendonukleasen prokaryontischer Herkunft verwendet, die bestimmte, kurze DNA-Sequenzen erkennen und hydrolytisch spalten. Dabei entstehen entweder stumpfe *blunt-end*- oder überhängende *sticky-end*-DNA-Stücke. Je nach Restriktionsenzym werden verschiedene Puffer-

bedingungen und optimale Temperaturen benötigt. Eine Einheit Restriktionsenzym spaltet bei optimalen Reaktionsbedingungen 1 mg DNA pro Stunde. Der Restriktionsverdau wurde z.B. mit EcoRI zur Prüfung einer erfolgreichen Ligation eines Inserts in den Klonierungsvektor durchgeführt. EcoRI schneidet in der MCS des pGEMT-easy Vektors, wodurch klonierte PCR-Produkt ausgeschnitten werden können.

Analytischer Verdau (20 µl):

10 µl Miniprep-DNA
2 µl Reaktionspuffer (10 ×)
1-5 U Restriktionsenzym
ad ddH₂O

Der Ansatz wurde für etwa 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des Probenpuffers wurde die DNA in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt und analysiert.

Klonierung von GRK2- und GRK5-Promotorkonstrukten sowie dessen 3'UTR

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung identifizierter SNPs wurden die spezifischen Genabschnitte in Reportervektoren kloniert. Die das Insert enthaltenden Vektoren wurden anschließend in Zellsysteme transfiziert und über funktionelle Assays untersucht. Dies soll einen möglichen Einfluss der SNPs auf die Promotor-Aktivität identifizieren. Ziel der 3'UTR-Klonierung ist es, Aussagen über deren Bedeutung als potentielle Bindungsstelle für endogene miRNAs zu treffen und einen möglichen Einfluss des Polymorphismus *GRK2* A(+19,410)G darzustellen. Zur Amplifizierung der jeweiligen Genabschnitte (Inserts), wurden die Primer „Primer zur Klonierung“ (siehe Anhang) eingesetzt. Um Klonierungen unspezifischer Genabschnitte auszuschließen, wurde eine Gelelektrophorese mit Größenkontrolle des PCR-Produkts durchgeführt. Anschließend wurden die Produkte aufgereinigt bzw. aus dem Agarose-Gel extrahiert. Die Klonierung wurde wie folgt durchgeführt.

A-Tailing der PCR-Produkte

Da die PCR zur Herstellung der gewünschten Genabschnitte mit der Pfu-Polymerase durchgeführt wurde, musste ein sog. *A-Tailing* stattfinden, um die Voraussetzungen für eine Klonierung in den pGEMT-easy-Vektor zuschaffen. Die Pfu-Polymerase produziert *blunt-end* PCR-Produkte. Zur Klonierung ist jedoch ein Adenosinüberhang notwendig, um sich mit den 3`T-Überhängen des Vektors zusammen zulagern. Dazu wurde exakt nach Protokoll des pGEMT-easy Kit (Promega, Darmstadt, Deutschland) vorgegangen, bei dem durch eine Taq-Polymerase ein Poly-A-Schwanz an das vorhandene Insert gelagert wird.

Ligation mit dem pGEMT-easy Klonierungskit

Die Ligationen mit dem pGEMT-easy Vektor wurden mit der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase durchgeführt. Diese verknüpft freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA durch Bildung einer Phosphodiesterbindung. Dem Ansatz wurde zusätzlich ein dem pGEMT-easy Klonierungskit zugehöriger Puffer und das durch „A-Tailing“ vorbereitete PCR-Produkt beigelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Transformation in E.coli DH5α

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Die Plasmid-DNA kann dann im Bakterium *Escherichia coli* vermehrt werden. Der Bakterienstamm (DH5α, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) war zur besseren Anheftung des Plasmids an die Außenhülle des Bakteriums eisgekühlt. 20 µl der Bakterien im Bakterienmedium wurden mit 1 µl des Ligationsansatzes (1:5 verdünnt in Tris EDTA Puffer, 10 mM/1 mM) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Um die Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Bakterien einem kurzen (40 sec) Hitzeschock von 42 °C unterzogen und anschließend 2 min auf Eis gelagert. Danach wurden 80 µl

SOC-Medium (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt und die Bakterien 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Zum Schluss wurden je 80 µl auf Platten mit Bakterienmedium zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Ampicillin- und blau / weiß-Selektion

Bei einer Ligation und Transformation nimmt nur ein Teil der Plasmide das gewünschte DNA-Stück auf und nur ein kleiner Teil der Bakterien nimmt wiederum das Plasmid auf. Daher werden zwei Eigenschaften des Plasmids zur Selektion genutzt. Nur Bakterien, die Plasmid aufgenommen haben, wachsen auf den Platten aus Bakterienmedium, da nur sie die Plasmid-kodierte Antibiotikaresistenz ausprägen. Allerdings bedeutet die Anwesenheit einer Antibiotikaresistenz nicht, dass alle transformierten Klone über ein Insert verfügen. Deswegen bedient man sich der blau / weiß- Selektion. Die Plasmide, in denen die erwünschte DNA-Sequenz aufgenommen wurde, verlieren bei diesem Vorgang, durch Unterbrechung der Sequenz, ihr funktionierendes β -Galactosidase-Gen. Solche Bakterien erscheinen dann weiß, da sie das im Medium vorhandene X-Gal nicht umsetzen können. Bakterien, die ein „leeres“ Plasmid aufgenommen haben erscheinen blau. Diese weißen Klone wurden in flüssiges Bakterienmedium eingebracht und inkubiert. Eine kleine Menge der Klone wurde zusätzlich für eine Kontroll-PCR vorbereitet.

Präparation von Plasmid-DNA

Es kamen zwei Verfahren zum Einsatz, die sog. *Miniprep* für den analytischen Maßstab, d.h. zur Analyse eines bestimmten Plasmids, und für den präparativen Maßstab eine sog. *Maxiprep*. Für beide Verfahren wurden kommerziell erhältliche Kits (*QIAprep Miniprep* bzw. *Maxiprep*, Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Hersteller Protokoll eingesetzt.

DNA-Sequenzierung

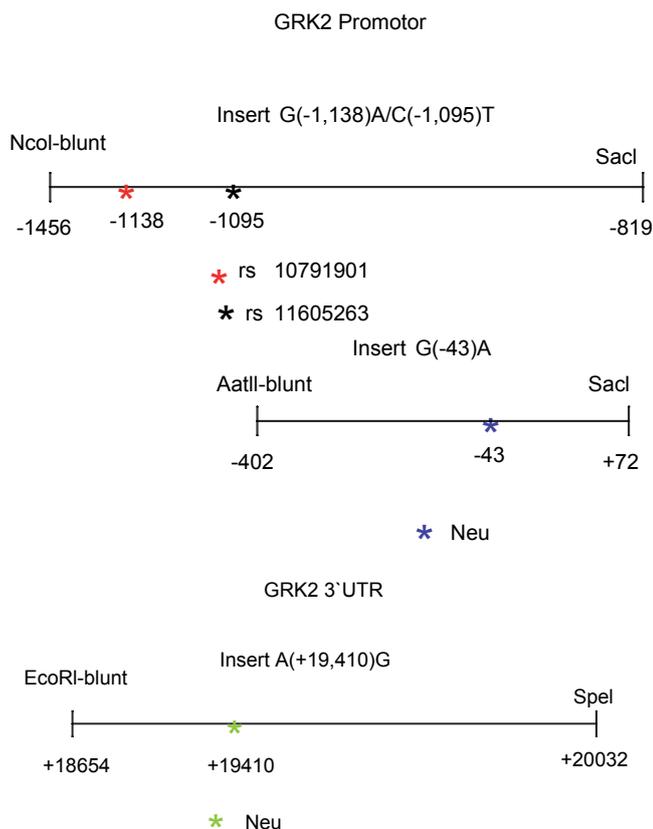
Die DNA-Sequenzanalyse basiert auf einer DNA-Kettenverlängerungsreaktion nach der Sanger-Methode¹⁴⁵. Grundlage ist dabei die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, außer Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) als Substrate zu verwenden. Das für die Reaktion eingesetzte Nukleotidgemisch enthält außer den vier Desoxynukleotiden auch jeweils ein Dideoxynukleotid. Dadurch kommt es auch zum Einbau dieser ddNTP's, die ein weiteres Wachstum der Kette blockieren, da ihnen ein 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Bei der automatisierten DNA-Sequenzierung wird ein fluoreszenzmarkierter Primer eingesetzt, mit dem mittels PCR in vier verschiedenen Reaktionsansätzen basenspezifische Kettenabbruchprodukte unterschiedlicher Länge erzeugt werden. Die Reaktionsgemische werden auf ein Sequenziergel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die durch das Gel wandernden Banden anhand eines Lasers detektiert. Die Daten werden im Computer gespeichert und analysiert. Plasmide, bei denen im Restriktionsverdau die erfolgreiche Ligation des Inserts bestätigt werden konnte, wurden zur Sequenzierung eingeschickt. Alle nötigen Sequenzierarbeiten wurden durch *GATC Biotech* (Konstanz, Deutschland) und *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

Umklonierung der Promotor-Konstrukte und des 3'UTR-Konstrukte

Durch die Sequenzierung wurden die Inserts auf Fehler in ihrer Sequenz kontrolliert, außerdem konnten die Genotypen der SNPs festgestellt und die für weitere Arbeiten benötigten Konstrukte ausgewählt werden. Die Promotorkonstrukte wurden dann in den pGl 4.10 (Promega, Mannheim, Deutschland) und die 3'UTR in den pMIR Report Luciferase Vektor (Ambion, Darmstadt, Deutschland) umkloniert.

→ Abb. 10

Generierung der GRK2-Promotor und -3'UTR Inserts zur Klonierung mit Darstellung identifizierter SNPs



→ **Abb. 10:**

Erklärendes Beispiel; das Insert G(-43)A wurde mit dem Restriktionsenzym AatII an der Position -402 der Gensequenz behandelt. Für die weitere Klonierung wurde dieser Teil zu einem *blunt-end* weiter bearbeitet. Der identifizierte SNP befindet sich an Position -43 der Gensequenz und ist durch * gekennzeichnet.

Restriktionsverdau und Richtungsklonierung:

Es wurde ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* durchgeführt, um die Konstrukte aus dem pGEMT-easy-Vektor auszuschneiden.

präparativer Verdau (50 µl):

10-30 µl Plasmid-DNA (je nach Konzentration und Größe)

5 µl Reaktionspuffer (10×)

2-10 U Restriktionsenzym

ad ddH₂O

Der Ansatz wurde für etwa 90 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel, die Gelextraktion des Inserts und dessen Aufreinigung. Die Restriktionsenzyme mit denen die jeweiligen Inserts und Vektoren behandelt wurden sind der folgenden Tabelle (→ Tab. 4) zu entnehmen. Dabei richtet sich der Restriktionsansatz immer nach obigem Schema und wurde jeweils 90 min bei 37 °C inkubiert.

→ Tab. 4:

Schema behandelter Inserts der GRK2 und GRK5 und deren Vektoren mit Restriktionsenzymen.

Klonierung <i>GRK2</i> :			Klonierung <i>GRK5</i> :		
Inserts/ Vektoren	Restriktions- enzyme	Länge (-mer)	Inserts/ Vektoren	Restriktions- enzyme	Länge (-mer)
Insert G(-1,138)A/ C(-1,095)T	NcoI-blunt SacI	Pos. -1456 bis -819 (insg. 637 bp)	Insert ATT (-1437,-1435, -678)	NcoI-blunt SacI	Pos. -1559 bis -22 (insg. 1537 bp)
Insert G(- 43)A	AatII-blunt SacI	Pos. -402 bis +72 (insg. 474 bp)	Insert GCC (-1437,-1435, -678)	NcoI-blunt SacI	Pos. -1559 bis -22 (insg. 1537 bp)
Insert A(+19,410)G	EcoRI-blunt SpeI	Pos. +18654 bis +20032 (insg. 1378 bp)	Insert ACC (-1437,-1435, -678)	NcoI-blunt SacI	Pos. -1559 bis -22 (insg. 1537 bp)
pGI 4.10 für Insert G(-1,138)A/C (-1,095)T/G(- 43)A	KpnI-blunt SacI		pGI 4.10 für Insert ATT,GCC,ACC	KpnI-blunt SacI	Pos. -1559 bis -22 (insg. 1537 bp)
pMIR-Report Luciferase	NaeI-blunt SpeI	Pos. +18654 bis +20032 (insg. 1378 bp)			

→ Tab. 4:

Schema behandelter Inserts der GRK2 und GRK5 und deren Vektoren mit Restriktionsenzymen.

Das Insert der GRK2 G(-1,138)A/C(-1,095)T beinhaltet die SNPs G(-1,138)A und C(-1,095)T und wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und SacI behandelt, wobei die NcoI Schnittstelle auf ein *blunt-end* aufgefüllt wurde. Das gesamte klonierte Insert ist insg. 637 bp lang und reicht von Position -1456 bis -819. Alle Inserts wurden in *sense*-Richtung kloniert.

Um die jeweiligen Inserts in *sense-Richtung* umklonieren zu können, wurde eine Richtungsklonierung durchgeführt. Dazu werden die in den pGEMT-easy klonierten PCR-Produkte mit den spezifischen Enzymen aus dessen MCS heraus geschnitten. Ebenso wird der Reportervektor so mit Enzymen behandelt, dass bei der späteren Ligation die Schnittstellen von Insert und Vektor identisch sind und in *sense-Richtung* zusammen passen. Da jedoch nicht immer alle Schnittstellen der MCS von pGEMT-easy und Reportervektoren aufeinander abgestimmt sind, muss in diesem Fall auf *blunt-end* kloniert werden. Dies bedeutet, dass die jeweiligen Enden von Insert und Vektor mit *Klenow-Fragment* aufgefüllt und so für die Ligation aneinander angepasst werden. Als *Klenow-Fragment* wird die größere der beiden Untereinheiten der DNA-Polymerase von *Escherichia coli* bezeichnet, welche über ihre Polymerasefunktion in der Lage ist 5' überstehende, einzelsträngige DNA Sequenzen aufzufüllen. Gleichzeitig werden 3' überstehende, einzelsträngige DNA Sequenzen von ihr abgebaut, was die sog. Endonucleasefunktion darstellt. Beide Funktionen führen also zur Herstellung von *blunt-ends*, die bei der Ligation mittels T_4 -Ligase verbunden werden können.

Klenow-Ansatz zur blunt-end-Bildung:

30 μ l aufgereinigtes PCR Produkt
1 μ l dNTP Mix (2mM)
4 μ l *Klenow* Puffer
1 μ l *Klenow* Fragment
4 μ l Aqua dest.

Der Ansatz wird für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 min auf 70°C erhitzt, um das *Klenow-Fragment* zu inaktivieren. Bei den aufgereinigten PCR Produkten handelt es sich entweder um Vektoren oder um zur Ligation vorgesehene Inserts, die zuvor mit dem jeweiligen Restriktionsenzym behandelt wurden. Werden Vektor und Insert mit dem gleichen Restriktionsenzym behandelt, entstehen *sticky-ends*, die sich aufgrund komplementärer Basenpaarung zusammenlagern können.

Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit CIAP:

Die durch die Restriktion entstandenen offenen Vektor-Enden wurden dephosphoryliert um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern. Dies geschah mittels CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*), welche die Entfernung der 5'-Phosphatgruppe von DNA, RNA, sowie Ribo- und Desoxyribonucleosidtriphosphaten katalysiert. Dadurch konnte die T4-DNA-Ligase keine Verknüpfung von Hydroxylenden zu Phosphatenden durchführen und der Vektorhintergrund bei Klonierungen wurde minimiert. Nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase folgte wiederum eine Aufreinigung.

Ligation mit den Vektoren pGl 4.10 bzw. pMIR-Report Luciferase:

Ligationen mit diesen Vektoren wurden mittels T4-DNA-Ligase LC (Fermentas, Leon-Rot, Deutschland) streng nach Protokoll durchgeführt. Daran schloss sich die Transformation in *E.coli* DH5 α und die Aufbereitung der Plasmid-DNA, analog zum Vorgehen mit dem pGEMT-easy Vektor an. Mit den transformierten Bakterienkolonien wurde eine Klon-PCR durchgeführt, um die *sense*-Richtung der Inserts zu garantieren. Dazu wurde der jeweilige *antisense*-Primer des Inserts mit dem *forward*-Primer des jeweiligen Vektors benutzt (Anhang, „Primer zur Richtungskontrolle der Inserts“). Zusätzlich wurden die Konstrukte nochmals sequenziert, um ein fehlerfreies Insert zu garantieren.

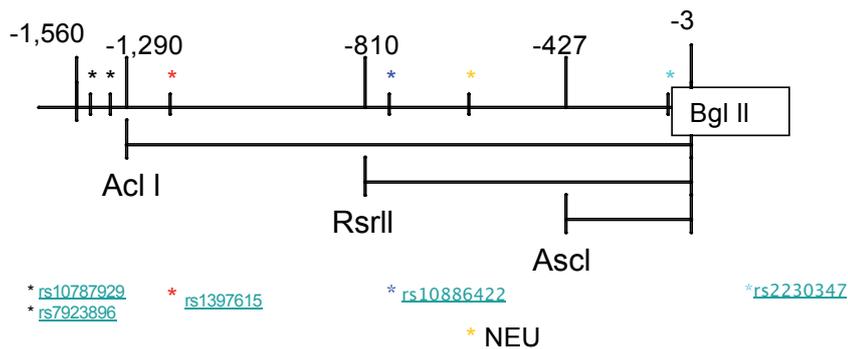
Generierung von Deletionskonstrukten des GRK5-Promotors:

Die Herstellung von Deletionskonstrukten dient der Untersuchung der Promotor-Aktivität. Dabei werden unterschiedlich große Abschnitte des Promotors in einen Reportervektor kloniert und funktionell untersucht. Auf diese Weise können Bereiche sehr hoher oder niedriger Promotor-Aktivität identifiziert werden. Bei der Herstellung von Deletionskonstrukten wird das Plasmid welches, das Insert enthält mit Hilfe von Restriktionsenzymen so geschnitten, dass mehrere Konstrukte mit unterschiedlich großen Anteilen an Insertfragmenten entstehen. Die so generierten Konstrukte werden anschließend auf Unterschiede in ihrer Aktivität im *Luciferase-Assay* untersucht. Dazu wurde hier der Vektor pGl 4.10, der den Promotorbereich enthielt, mit den in der Abbildung dargestellten Restriktionsenzymen behandelt, so dass 5 Konstrukte mit progressiv kleiner werdenden Promotorabschnitten korres-

pondierend zum Transkriptionsstartpunkt entstanden (→ Abb. 11). Die ersten beiden Konstrukte, die mit dem Enzym Bgl II und Acl I versetzt wurden, enthielten somit den größten Anteil des Promotorbereichs ab Basenpaar -1,290. Dabei wurde jeweils der Genotyp CC bzw. TT des bei der Sequenzierung identifizierten SNPs C(-678)T als Ausgangskonstrukt verwendet. Es entstanden so die Konstrukte *GRK5*_-1,290_C(-678)C und *GRK5*_-1,290_T(-678)T. In gleicher Weise entstanden mit dem jeweiligen Restriktionsenzym die folgenden Konstrukte: *GRK5*_-810_C(-678)C, *GRK5*_-810_T(-678)T und *GRK5*_-427.

→ Abb. 11:

Generierung der *GRK5*-Promotor und -3'UTR Inserts zur Klonierung mit Darstellung identifizierter SNPs



Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese dient u.a. der Generierung fehlerfreier Konstrukte, bei denen im Verlauf der Klonierung Mutationen in der Sequenz aufgetreten sind. Die fehlerhaft eingebauten Basen werden bei der *In-vitro*-Mutagenese durch die korrekten Nukleotide ersetzt. Dazu werden für die spezifische Sequenz Primer entwickelt, wobei das entsprechend fehlerhafte Nukleotid gegen das korrekte ausgetauscht wird. Bei der anschließenden PCR wird das jeweilige Konstrukt mit Hilfe der Primer umgeschrieben, so dass neben den ursprünglich fehlerhaften Konstrukten neue, mit der korrekten Sequenz versehene, Konstrukte entstehen.

Um die fehlerhaften, ursprünglichen Konstrukte von den neu synthetisierten zu selektieren, wird ein sog. Dpn I-Verdau durchgeführt. Die Zielsequenz dieses Enzyms ist 5'-Gm⁶ATC-3', womit dieses spezifisch für methylierte bzw. hemimethylierte DNA verdaut. Isolierte DNA aus E.coli Stämmen ist im Gegensatz zu *In-vitro* amplifizierter DNA dam⁺-methyliert und wird bei diesem Schritt durch das Enzym zerschnitten. So bleiben lediglich die neu synthetisierten, fehlerfreien Konstrukte bestehen. Diese werden im nächsten Schritt in *XL10-Gold*[®] ultrakompetente Zellen transformiert, aus den Zellen isoliert und aufgereinigt. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte streng nach Protokoll des *QuikChange*[®] *II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Darmstadt, Deutschland). Die verwendeten Primer sind im Anhang unter „Primer zur Mutagenese von GRK5-Promotorkonstrukten“ aufgeführt.

3.2.4.

Arbeiten mit RNA

RT-Reaktion zur cDNA Gewinnung

Die normale Taq-Polymerase ist nicht in der Lage RNA zu vermehren. Hierzu wird die sog. *Reverse Transkriptase* genutzt. Diese überführt die relativ instabile und vom Abbau durch RNase bedrohte RNA in stabilere DNA, die sog. cDNA zurück. Die cDNA-Gewinnung wird mit Hilfe des Kits *SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase* (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) unter Anwendung des vorgeschriebenen Protokolls durchgeführt. Die erhaltene cDNA kann mittels Taq-Polymerase wieder amplifiziert werden.

Isolierung von total RNA inklusive mikroRNA aus Geweben und Zellen

Um die Konzentration von miRNA in verschiedenen Geweben und Zelllinien quantifizieren zu können, wurden diese mit dem *miRNeasy Mini Kit*[®] (Qiagen, Hilden, Deutschland) zur Isolierung der RNA behandelt. Dabei wurde streng

nach Protokoll des Herstellers vorgegangen, wobei die eingesetzte Menge des jeweiligen Gewebes 50 mg betrug. Zur Isolierung aus Zelllinien wurden wie vom Hersteller empfohlen, nicht mehr als $3\text{-}4 \times 10^6$ Zellen eingesetzt.

Quantifizierung der miR-1-, miR-133a/b und miR-208-Konzentration in humanen und murinen Geweben und Zelllinien

Die miRNA-Konzentrationen wurden in Herzohrgewebe in verschiedenen humanen und murinen Geweben sowie in Zelllinien bestimmt. Dies erfolgte mittels *TaqMan® MicroRNA Reverse Transkription Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), sowie mit den für die jeweilige miRNA spezifischen Assays, *TaqMan® Micro RNA-Assay, hsa-miR 1* (Applied Biosystems), *TaqMan® Micro RNA-Assay, hsa-miR 133a* (Applied Biosystems), *TaqMan® Micro RNA-Assay, hsa-miR 133b* (Applied Biosystems) und *TaqMan® Micro RNA-Assay, hsa-miR 208* (Applied Biosystems). Die einzelnen Arbeitsschritte sowie die Einstellungen im TaqMan-System zur Detektion der miRNA richteten sich streng nach Angaben des Herstellers.

Zusammenfassend erfolgt die Quantifizierung der zuvor aus dem Gewebe oder Zellen isolierten miRNA durch eine sog. *two-step RT-PCR*. Hier wird im ersten Schritt die RT-Reaktion durchgeführt, d.h. eine Umschreibung der miRNA Sequenz in cDNA mittels der für miR-1, miR-133a, miR-133b und mi-208 spezifischen Primer. Die Primer stellen sog. *looped*-Primer dar, die eine Anlagerung an die charakteristische *hairpin-Struktur* der miRNA ermöglichen. Hier ist von besonderer Bedeutung, dass in diesem Schritt einzig die miRNA von Interesse umgeschrieben wird. Dies garantiert der nur für diese miRNA generierte Primer. Diese RT-Reaktion ist also für die jeweilige miRNA hochspezifisch. Im zweiten Schritt, dem PCR-Schritt, erfolgt die Amplifizierung des PCR-Produktes und so die quantitative Erfassung der miRNA-Konzentration. Dabei lagert sich die im Kit enthaltene *TaqMan mgB Probe* an die komplementäre Sequenz zwischen *forward* und *reverse* Primer der jeweiligen miRNA. Bei der Synthese der PCR-Produkte durch die Polymerase wird schließlich auch die TaqMan-Probe von ihrem komplementären

Strang abgespalten, wobei ein Fluoreszenzsignal entsteht, welches mit steigender Amplifizierungsrate akkumuliert und bei Erreichen eines festgelegten Schwellenwertes erfasst wird. Je mehr Produkt in den Proben vorliegt, desto weniger Zyklen bei der Amplifizierung sind nötig um den Schwellenwert zu überschreiten. Die Anzahl der Zyklen bis zur Erfassung des Fluoreszenzsignals ist also umgekehrt proportional zur miRNA Konzentration. Es handelt sich hier um eine doppelt spezifische Untersuchungsmethode, da die TaqMan-Probe für jede miRNA spezifisch ist und nur hybridisierte Probes, die von der Polymerase abgespalten werden, ein Lichtsignal erzeugen.

Real-time PCR

Mit der quantitativen Real-time PCR, oder auch Echtzeit-PCR, werden Nucleinsäuren quantitativ erfasst. Unter den mehreren mittlerweile etablierten Methoden wurde hier das TaqMan-Verfahren¹⁴⁶ angewandt. Durch die Real-time-PCR-Technik lassen sich Aussagen über die Quantität von definierter mRNA in einem spezifischen Gewebe treffen. Es erfolgt also somit eine Untersuchung der Genexpression auf RNA-Ebene. Um Rückschlüsse auf die RNA-Quantität in Zellen bzw. Geweben ziehen zu können, wird die gewonnene RNA in einer RT-Reaktion in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche im nächsten Schritt mittels der zu beschreibenden Methode quantifiziert wird. Hierbei wird jedoch nicht die absolute Menge des PCR-Produkts gemessen, vielmehr nutzt man die Kinetik der PCR-Reaktion, um die spezifische Menge an amplifiziertem Produkt zu ermitteln. In den frühen Zyklen der PCR-Amplifizierung kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte. Später akkumuliert das Produkt, so dass sich der Prozess verlangsamt und schließlich zum Stillstand kommt. Die Vervielfältigung wird mit Hilfe von Fluorophoren sichtbar gemacht und kann dann durch eine Kamera detektiert werden. Man vergleicht dann die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase mit einem Standard, dem sog. *Housekeeping*-Gen, hier β -Aktin. Von diesem Standard sind die eingesetzten Templatemengen bekannt, so dass man auf die Ausgangsmenge zurückrechnen kann. Die für die Quantifizierung benötigten Primer sind im Anhang unter „Primer für Real-time PCR“

zu entnehmen. Hier ist wichtig, dass die Primer Intron überspannend gewählt werden und das Produkt im Optimum zwischen 150 und 200 bp liegt. Die PCR und die Primer für das *Housekeeping*-Gen β -Aktin werden wie in der Literatur beschrieben eingesetzt¹⁴⁷. Der PCR-Ansatz wird unter exakter Verwendung des Protokolls und des kommerziell erhältlichen *Quantitect SYBR Green Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) pipettiert. Die PCR wird in einem *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), das während der PCR die Signale des SYBR-Green detektiert, durchgeführt. Für jedes der untersuchten Gene wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe zur Etablierung durchgeführt. Die Effizienz der PCR betrug > 95 %, was mit der Effizienz von β -Aktin vergleichbar ist¹⁴⁷. Die relative Expression der untersuchten Gene im Vergleich zu β -Aktin wird errechnet unter Benutzung der Formel: $\text{Gen} / \beta\text{-Aktin} = 2^{-[\text{Ct}(\text{Gen}) - \text{Ct}(\beta\text{-Aktin})]}$ wobei Ct (*Cycle time*) die Anzahl der Zyklen ist, bei der das Fluoreszenzsignal eine vordefinierte Intensität erreicht.

RNase-Protection-Assay

Soweit nicht anders angegeben wurde streng nach Protokoll des Herstellers gearbeitet. Bei der Methode des *RNase-protection-Assays* wird RNA aus Gewebe oder Zellen isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einem Film sichtbar gemacht. Die quantitative Darstellung der RNA von Interesse erfolgt dabei über radioaktiv gelabelte Sonden, die in einer Hybridisierungsreaktion mit der komplementären, isolierten RNA binden und so detektiert werden können. Der *RNase-Protection-Assay* ermöglicht somit eine Quantifizierung sowie visuelle Darstellung von spezifischen RNA-Molekülen. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von miRNA-Molekülen (hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b hsa-miR-208) in Herzohrgewebe untersucht.

Synthese der Sonden:

Zur Generierung der später radioaktiv gelabelten Sonden wurde das *mirVana™ miRNA Probe Construction Kit* von Ambion (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Dazu wurden zunächst Oligonukleotide, die der Sequenz der miRNAs entsprechen, erstellt (MWG, Ebersberg, Deutschland), wobei die Base Uridin durch Thymin ersetzt wurde. Zusätzlich wurde an das 3`Ende der Sequenz eine zum T7 Primer, im Kit, komplementäre Sequenz (CCTGTCTC) angehängt, um eine Anlagerung des Primers zu gewährleisten. Eine sog. *Klenow*-DNA-Polymerase bildet anschließend eine dsDNA, die von der T7-RNA Polymerase transkribiert werden kann. Bei der Transkription wurde in diesem Fall [α - ^{32}P] gelabeltes UTP für die RNA-Synthese verwendet. Gleichzeitig wurde vom Hersteller als Kontroll-RNA eine miR-16-Sonde generiert, die bereits erfolgreich zur Detektion der miR-16 in zahlreichen humanen und murinen Geweben sowie Zelllinien genutzt wurde¹⁴⁸. Als interne Kontrolle für die Transkriptionseffizienz im zu untersuchenden Herzohrgewebe wurde zusätzlich eine U6-Sonde eingesetzt, da diese in Säugerzellen eine besonders hohe Transkriptionsrate aufweist¹⁴⁹. Bei der Synthese der dsDNA sowie bei der *In-vitro*-Transkription wurde streng nach Protokoll des Herstellers vorgegangen, wobei die UTP Nukleotide mit 800 Ci/ mmol [α - ^{32}P] UTP also 10 mCi/ ml= 12,5 μM gelabelt wurden. Die Transkripte wurden anschließend über ein 12 %iges Polyacrylamidgel, aufgereinigt.

cpm-Bestimmung:

Um zu bestimmen wieviel Radioaktivität die gelabelten Sonden aufweisen, wurde die sog. Cerencov-Messung durchgeführt. Die Cerencov-Messung lässt sich zur Messung der Aktivität von β -strahlenden Radionukliden verwenden, sofern die Maximalenergie der β -Strahlung über etwa 300 keV liegt, wie z. B. bei ^{32}P . In diesem Fall handelt es sich um [α - ^{32}P] UTPs. Zur Messung der Strahlung wurde ein Flüssigkeitsszintillationsdetektor verwendet.

Hybridisierungsreaktion und Gelelektrophorese:

Dies erfolgte mittels *mirVana miRNA Detektion Kit* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Bei der Hybridisierungsreaktion wird die gelabelte RNA-Sonde zusammen mit der aus dem Herzohrgewebe isolierten RNA, einem spezifischen Hybridisierungspuffer, Nuclease-freiem Wasser und einer *Yeast*-RNA (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zusam-

men gegeben. Die *Yeast*-RNA wird verwendet, um in jeder Hybridisierungsreaktion die gleiche Menge an RNA einzusetzen, damit die RNase-Verdau-Konditionen bei jeder Reaktion die selben sind. Es können so Unterschiede in der RNA-Menge ausgeglichen werden. Die Menge an eingesetzter RNA aus Herzohrgewebe betrug 0,5 µg. Die Ansätze wurden dann bei 95 °C für 3min und schließlich bei 42 °C über Nacht inkubiert. Anschließend folgte ein RNase-Verdau, wobei unhybridisierte RNA-Moleküle und überschüssige Sonden eliminiert werden sollen. Zusätzlich zu den Herzohrgewebsproben wurden zwei weitere Kontrollproben eingesetzt. Zum einen zur Kontrolle der Qualität und der Ausbeute der einzelnen Proben, zum anderen um unspezifische Hintergrundsignale zu beurteilen und zu verifizieren, dass der RNase-Verdau vollständig abgelaufen ist. Dazu wurde in einer Probe nur die Sonde ohne isolierte RNA und RNase-Verdau angesetzt und eine Probe ohne isolierte RNA. Für die Gelelektrophorese wurde nun ein 15 % iges Polyacrylamidgel verwendet, damit kleine Moleküle besser aufgetrennt werden können. Als Laufpuffer diente ein 1× TBE-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 bis 30 mA bis die sichtbaren *Bromphenol blau Banden* etwa die Mitte des Gels erreichten. Daraufhin erfolgte die Exposition des Gels auf einem spezifischen Film (Kodak scientific imaging Films). Die Belichtungszeiten reichten von einer bis zu zwölf Stunden.

3.2.5.

Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten werden unter Beachtung der erforderlichen Sterilität unter einer Reinraumbank durchgeführt.

Kultur von HEK293-, Hela-, A 10- und HASM-Zellen

Die Zelllinien HEK293 und A10 wachsen bei 37 °C in einer wassergesättigten Raumlufatmosphäre, der 5 bis 10 % Kohlenstoffdioxid zugesetzt wurde. Die Zellen wurden in DMEM-Medium kultiviert. Um die Teilungsaktivität der Zellen zu erhalten, wurden diese bei Erreichen des Konfluenzstadiums gesplittet. Jede

Zellart hat bei gleichen Kulturbedingungen ihre eigene charakteristische Verdopplungszeit. HEK293-Zellen sind schnell wachsende Zellen, die alle 2–3 Tage unter Zugabe frischen DMEM-Mediums im Verhältnis 1:5 oder 1:6 gesplittet wurden. A10-Zellen sind langsam wachsende Zellen, eine Subkultivierung wurde einmal/Woche mit einem Splittingverhältnis von 1:2 oder 1:3 durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit der Casy1-Apparatur (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) durchgeführt. Die Apparatur misst mittels der sogenannten Pulsflächenanalyse, einer Abwandlung des Widerstandsmessprinzips, die Zellgröße eines einzelnen Messereignisses. Jede Zelle verdrängt bei ihrem Durchfluss durch die Messkapillare eine genau bestimmte Menge einer geeichten Elektrolytlösung. Die dadurch entstehende Widerstandserhöhung ist ein direktes Maß für das Volumen der Zelle. HASM-Zellen wurden in Medium 231 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit SMGS-Zusatz kultiviert. Bei diesem Zusatz handelt es sich um ein *smooth muscle growth supplement* (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), welches spezifisch für das Wachstum dieser Zellen entwickelt wurde. Es enthält neben Wachstumsfaktoren und Hormonen auch 5 % fötales Kälberserum sowie Insulin. Um optimale Wachstumsbedingungen zu erzielen, wurde in einem Abstand von 48 Stunden ein Mediumwechsel vollzogen und einmal/Woche mit einem Splittingverhältnis von 1:2 oder 1:3 subkultiviert. Raumluftatmosphäre und Kohlenstoffdioxid Konzentration sind identisch zur Kultivierung der bereits erwähnten Zelllinien. Ebenso wurde die Zellzahlbestimmung nach obigen Bedingungen durchgeführt.

Herstellung von Zellkernextrakten

Zellkernextrakte wurden für EMSAs benötigt. Das Proteingemisch der Zellkernextrakte enthält große Mengen von Transkriptionsfaktoren, so dass sowohl Promotorsequenzen als auch 3'UTRs auf mögliche Bindungsstellen untersucht werden konnten. Zunächst wurde das Medium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit Trypsin bzw. Trypsin-EDTA abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das restliche PBS abgesaugt und das Zellpackvolumen bestimmt. Nach dem Zellpackvolumen

richtete sich die Menge der zu pipettierenden Lösungen. Die weiteren Extraktionsschritte erfolgten streng nach Protokoll des *CellLytic™NuCLEAR™EXTRAKTION KIT* (Sigma, München, Deutschland). Erhaltene Zellkernextrakte wurden zunächst in flüssigen Stickstoff und anschließend bei -80°C eingefroren. Für diese Arbeit wurden Zellkernextrakte von HEK293-, A10- und HASM-Zellen hergestellt. Außerdem wurden Zellkernextrakte von zuvor stimulierten Zellen gewonnen. Dabei wurden HEK293-Zellen für 18 Stunden mit reinem DMEM-Medium ohne FKS-Zusatz inkubiert (= Serumentzug), um anschließend für 6 Stunden mit 10 % FKS stimuliert zu werden. Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden nach obigem Schema Zellkernextrakte gewonnen.

Transfektion

Eine Transfektion bedeutet das Einschleusen von Fremd-DNA in Zellen. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche verschiedene Methoden entwickelt, welche sich stark voneinander unterscheiden. Die Wahl der Methode bzw. des Transfektions-Kits hängt im großen Maß von den zu transfizierenden Zellen ab. A10-Zellen wurden mit *FuGENE® HD Transfection Reagent* (Roche, Mannheim, Deutschland) und HEK293-Zellen mit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) transfiziert. Die Transfektion erfolgte in einer 96-Loch-Platte zur Durchführung von *Dual-Glo Luciferase-Assays*.

Transfektion von A10-Zellen mit FuGene HD:

Die Transfektion von A10-Zellen erfolgte mit dem *FuGENE® HD Transfection Reagent* (Roche, Mannheim, Deutschland). *FuGene* ist ein Reagenz sehr vieler Komponenten, u.a. einer Mischung verschiedener Lipide, die nicht Liposomen bildend sind. Diese Reagentien bilden Komplexe mit der DNA, die so in die Zelle aufgenommen werden kann. 24 Stunden vor Transfektion wurden 10^5 Zellen/100 μl DMEM mit 10 % FKS pro Loch in einer 96-Loch-Platte ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen 90 % konfluent. Die Transfektion erfolgte stets nach Angaben des Herstellers, wobei das Verhältnis von Transfektionsreagenz zu DNA 7:2 betrug und mit dem Transfektionsmedium *Opti-MEM®* (Invitrogen,

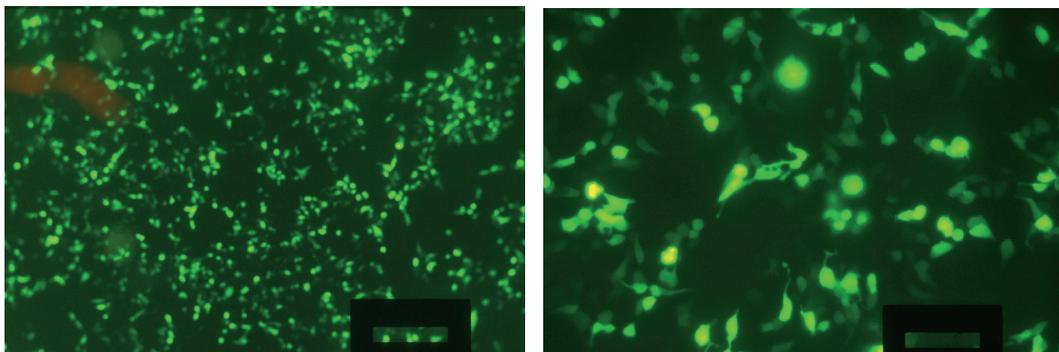
Darmstadt, Deutschland) durchgeführt wurde. Pro Ansatz betrug die Konzentration des Reporterplasmids 1,5 µg, die des Kontrollplasmids 0,5 µg. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Transfektion von HEK293-Zellen:

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte mit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Lipofectamine interagieren mit negativ geladenen DNA-Molekülen zu einem Liposomen-Polynukleotid-Komplex, da sie kationische Lipide sind. Dieser Komplex ist dem Aufbau der Zellmembran ähnlich und kann so ins Zellinnere und schließlich in den Zellkern gelangen. Am Tag vor der Transfektion wurden pro Loch 2×10^5 Zellen pro 100 µl DMEM mit 10 % FKS ausgesät. Die Zellen waren zur Transfektion 90 % konfluent. Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurde nach Angaben des Herstellers für die Transfektion mit *Lipofectamine 2000* vorgegangen. Dabei wurden 150 ng Reporterplasmid und 50 ng Kontrollplasmid pro Ansatz eingesetzt. Es lag dabei ein Verhältnis von DNA(µg) zu Lipofectamine (µl) von 1:2,5 vor. Zur Kontrolle der Transkriptionseffizienz wurde bei allen Transfektionsversuchen jeweils gesondert der pEGFP-C1-Vektor transfiziert und die Effizienz der Transfektion elektronenmikroskopisch beurteilt.

→ Abb. 12:

Transfektionskontrolle mittels pEGFP-C1-Vektor



→ Abb. 12

Transfektionskontrolle mittels pEGFP-C1-Vektor

Auf der linken Seite ist die erfolgreiche Transfektion im HEK293-Zellsystem, auf der rechten Seite bei A10-Zellen dargestellt.

3.2.6.

Dual Glo Luciferase-Assay

Das *Dual Glo™ Luciferase-Assay System* (Promega, Mannheim, Deutschland) dient der funktionellen Untersuchung von Promotor- bzw. 3' UTR-Konstrukten. Regulierende Faktoren können hier zum einen Transkriptionsfaktoren, zum anderen aber auch die an der posttranskriptionellen Genregulation beteiligten miRNAs sein. Ebenso sollen Genotyp-abhängige Unterschiede, die die Aktivität der Konstrukte beeinflussen können, indem sie die Bindung regulierender Faktoren begünstigen oder auch verhindern, identifiziert werden. Diese Methode beruht auf einem dualen Messsystem, bei dem die Aktivität zweier Reporter-Vektoren in einem Zellsystem gemessen wird. Der experimentelle Reportervektor enthält das zu untersuchende Insert, der sog. *Renilla*-Vektor stellt sich als Kontrollvektor dar, welcher unspezifische Störgrößen wie zum Beispiel Apoptose, Unterschiede in der Anzahl transfizierter Zellen, Schwankungen der Gesamtzellzahl sowie unterschiedliches Zellwachstum normieren soll. Es können somit spezifische von unspezifischen Aktivitäten unterschieden werden, was den Vorteil sehr genauer und gut vergleichbarer Messergebnisse zufolge hat. Der das Insert enthaltende Vektor muss, um in diesem System gemessen werden zu können, ein *Firefly Luciferase*-Gen enthalten, dessen Aktivität bei der ersten Messung durch das *Dual Glo Luciferase*-Reagenz detektiert wird. Hier wurde für sämtliche Promotorkonstrukte der *pGl 4.10* (Promega, Mannheim, Deutschland) und für Konstrukte der 3' UTR der *pMIR Report Luciferase Vektor* (Ambion, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Bei der zweiten Messung erfolgt die Ermittlung der *Renilla*-Aktivität durch Zugabe des *Dual Glo Stop & Glo*-Reagenz. Dies setzt das Vorhandensein eines *Renilla* Gens im Kontrollvektor voraus. Dazu wurde der *pGl 4.73* (Promega, Mannheim, Deutschland) bzw. für Stimulationsversuche der *pGl 4.74* (Promega, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Nach Abzug des *Backgrounds* (Hintergrundaktivität), der durch die Negativkontrolle (reines Transfektionsreagent mit *Dual Glo*-Reagenzien) ermittelt wird, wird der Quotient der beiden Messergebnisse ermittelt. Durch diese Normierung mittels Kontrollvektor sind die erhaltenen Aktivitätswerte der verschiedenen Inserts miteinander vergleichbar und können Genotyp-abhängige Unterschiede zuverlässig darstellen. Bei der Durchführung des Versuchs wurde, soweit nicht anders angegeben, streng nach Protokoll des Herstellers

vorgegangen. Zur Messung im Luminometer wurden die Zellen 6 bzw. 24 Stunden nach Transfektion aus der 96-Well-Platte gelöst und in Messröhrchen überführt. Die Messung erfolgte jeweils 10 Minuten nach Zugabe der Reagentien *Dual Glo Luciferase*-Reagenz und *Dual Glo Stop & Glo*-Reagenz. Die Messzeit betrug 1 Sekunde.

Stimulationsversuche:

Ziel der Stimulation transfizierter Zellen ist die Untersuchung des Einflusses spezifischer Substanzen auf die Aktivität transfizierter Konstrukte. Es gilt, die Konstrukt-Aktivität unter Bedingungen zu messen, in denen der Zellstoffwechsel durch bestimmte Stimuli aktiviert bzw. beeinflusst wird. Man geht davon aus, dass sich die endogene Zusammensetzung der Zelle verändert und so Einfluss auf die Aktivität der Gene ausübt. So sollen auch Aktivitätsunterschiede, die unter *steady state* (Zelle in Ruhe) Bedingungen nicht zum Ausdruck kommen, detektiert werden. Die Auswahl der zur Stimulation verwendeten Substanzen, richtete sich nach deren endogener Bedeutung für die GRK-Signalkaskade.

Stimulation von GRK2-Konstrukten:

Die Stimulation von *GRK2*-Konstrukten erfolgte im HEK293-Zellsystem, wobei das Aussähen der Zellen sowie die Transfektion wie beschrieben stattfand. Als Stimulationssubstanz diente Fötale Kälberserum, welches 10 % ig in DMEM eingesetzt wurde. 6 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch 75 µl desselbigen ersetzt. Dabei wurden die Proben zum einen unter Serumentzugsbedingungen (reines DMEM) zum anderen unter Serumstimulationsbedingungen (DMEM + 10 % FKS) untersucht. Die eigentliche Serumstimulation erfolgte 24 Stunden nach Transfektion mit 10 % FKS. Aktivitätsmessungen erfolgten zum Zeitpunkt 0, (Basalwert), nach 6 Stunden und nach 24 Stunden.

Stimulation von GRK5-Konstrukten:

Stimulationsversuche mit *GRK5*-Konstrukten erfolgten sowohl in HEK293- als auch A10-Zellen. Die Stimulation erfolgte 18 Stunden nach Transfektion. Die verwendeten Substanzen sowie deren Konzentrationen sind der folgenden Tabelle (→ Tab. 5) zu entnehmen.

→ Tab. 5:

Verwendete Substanzen zur Stimulation von GRK5-Konstrukten

Stimulanz	Forskolin	Angiotensin II	PMA	TNF- α	IL-8	IL-1 β	MIP-2
Konzentration	10 ⁻⁵ mol/L	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁹ mol/L	6 × 10 ⁻¹⁰ mol/L	500 ng/ml	3 × 10 ⁻¹⁰ mol/L	100 ng/ml

Dazu erfolgte nach der Transfektion eine 6-stündige Inkubation im Brutschrank, die zur Aufnahme der DNA in die Zellen diente. Anschließend wurde den Zellen für 18 Stunden Serum entzogen, indem das zur Transfektion verwendete FKS haltige Medium durch reines DMEM ersetzt wurde. Dadurch befanden sich die Zellen in einem gemäßigten Stoffwechsel. Nach 18 Stunden erfolgte die Stimulation mit Stimulationsreagentien, wie z.B. Angiotensin II. Die anschließenden Messungen erfolgten nach 6 Stunden im HEK293-System und nach 24 Stunden im A 10-Zellsystem.

3.2.7.

Arbeiten mit Proteinen

Electrophoretic mobility shift assay

In diesem Assay-System werden DNA-Fragmente auf Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren untersucht. Es handelt sich also um die Untersuchung einer DNA:Protein-Interaktion. Dabei wird ein entsprechendes DNA-Fragment über eine PCR amplifiziert, nicht radioaktiv markiert und zusammen mit einem Proteingemisch aus Zellkernextrakten inkubiert. Die verwendeten Primer für die jeweilig untersuchten Promotorabschnitte sind im Anhang unter „Primer zur Untersuchung der Bindung von Transkriptionsfaktoren“ zusammengefasst. Die Primer wurden so generiert, dass neben dem Nachweis der Bindung eines Transkriptionsfaktors auch mögliche Genotyp-abhängige Unterschiede festgestellt werden können. Bei der Durchführung des Assays binden entsprechende Transkriptions-

faktoren an die DNA und bilden Komplexe. Diese wandern bei einer Polyacrylamidgelelektrophorese langsamer durch das Gel, als DNA-Fragmente, an denen kein Protein gebunden ist. Nach dem Blotting kann der markierte Abschnitt über Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. Um Transkriptionsfaktoren nachzuweisen bietet sich eine vorherige Inkubation mit einem Antikörper an, es kommt dann zu einem noch langsameren Laufverhalten und es zeigt sich ein sog. *supershift*. Die Durchführung des EMSA erfolgte nach dem Protokoll des *DIG Gel Shift Kit*, (Roche, Leon-Rot, Deutschland).

Annaeling und Labeling von Oligonucleotiden:

In diesem Schritt werden zunächst die ss-Oligonukleotide hybridisiert, um anschließend mit Hilfe der terminalen Transferase, die Digoxigenin-11-ddUTP an das 3' Ende der Oligonucleotide hängt, gelabelt zu werden. An das Digoxigenin-11-ddUTP kann dann bei der Chemilumineszenz der Antikörper (anti-Digoxigenin-AP) binden und so sichtbar gemacht werden.

Bestimmung der Labeling-Effizienz: Dot Blot

Für optimale und reproduzierbare Ergebnisse ist die Bestimmung der *Labeling*-Effizienz entscheidend. Dazu wurde ein *Dot Blot* durchgeführt, der gewährleisten soll, dass verschiedene Bindungsstärken nicht auf ein unterschiedliches *Labeling* zurückzuführen sind. Es wurden dazu eine Reihe von Verdünnungen der DIG-gelabelten Oligonukleotide auf eine positiv geladene Nylonmembran im direkten Vergleich zu DIG-gelabelten Kontrolloligonukleotiden aufgetragen. Die Nucleinsäuren wurden anschließend mit *Cross-Linking* auf der Membran fixiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem der EMSA-Chemilumineszenz.

Gel-Shift Reaktion

Standard-EMSA-Protokoll:

→ Tab. 6:

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Bindungs-Puffer	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
poly [d(I-C)] (1 µg/ µl)	3,3 µl	3,3 µl	3,3 µl	3,3 µl
Poly-L Lysine(0,1 µg/ µl)	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
DIG-gelabelte Oligonukleotide (0,4ng/ µl)	2 µl	2 µl Genotyp1	2 µl Genotyp1	2 µl Genotyp1
Ungelabelte Oligonukleotide (0,1 µg/ µl)			1 µl (124fach) Genotyp1	1 µl (124fach) Genotyp2
Zellkernextrakt (10 µg)		2 µl	2 µl	2 µl
Aqua dest.	9,7 µl	7,7 µl	6,7 µl	6,7 µl

(→ Tab. 6)

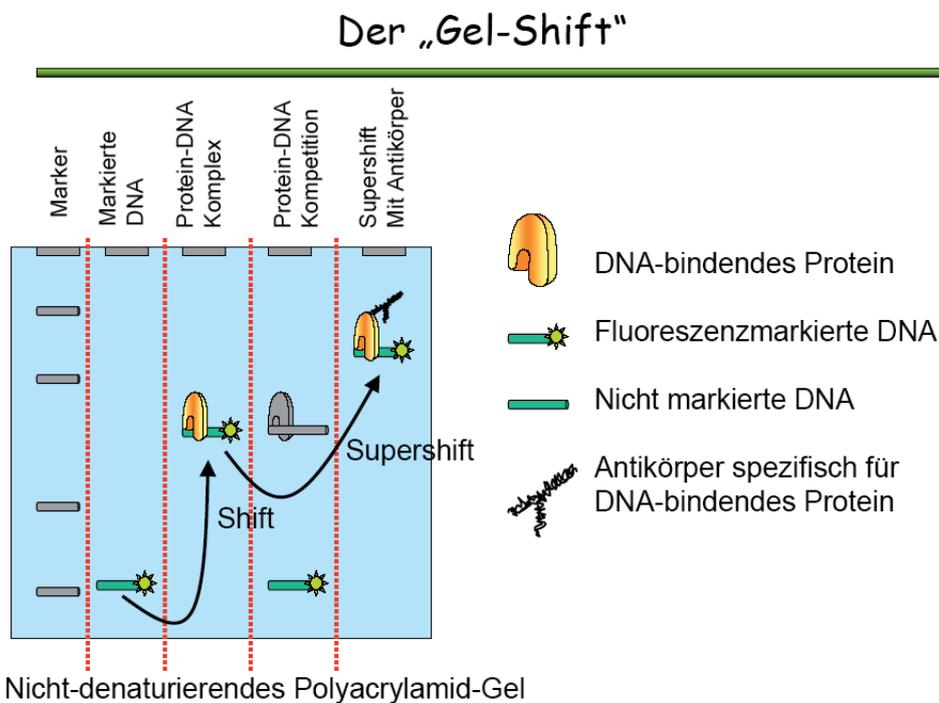
Die Pipettierung der Proben erfolgte auf Eis. Anschließend wurden diese für 20 min bei 23°C inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden die einzelnen Proben mit 5 µl *Loading-Buffer* versetzt und auf einem 6%igen *pre-run*-Gel aufgetragen.

Probe 1 enthielt nur gelabelte Oligonukleotide und stellte somit eine Negativkontrolle dar. In Probe 2 waren neben den gelabelten Oligonukleotiden auch Proteine aus Zellkernextrakten vorhanden, so dass es hier, im Falle einer Bindung, zu einem *Shift* kam. Probe 3 diente zur Überprüfung der Spezifität der Bindung, indem ein Überschuss (124fach) an ungelabelten Oligonukleotiden dazu gegeben wurde, die die Proteine abfangen sollen, wodurch keine spezifische Bande mehr zu erkennen wäre. Zur zusätzlichen Kontrolle auf Genotyp-anhängige Bindung der Transkriptionsfaktoren wurde in Probe 4 der 124fache Überschuss an ungelabeltem Genotyp2 dazu gegeben, wobei im Falle einer Genotyp-spezifischen Bindung, die Bande aus Probe 2 zu erkennen wäre. Im Falle einer Genotyp-unabhängigen Bindung würde keine spezifische Bande zu erkennen sein, da auch hier, wie in Probe 3, die Proteine abgefangen würden.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Bei einem EMSA werden DNA-Fragmente hauptsächlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Freie DNA wandert am schnellsten, während ein DNA-Protein-Komplex (*Shift*) ein langsames Laufverhalten zeigt. Im Falle der Bindung eines, für das an die DNA- gebundene Protein spezifischen Antikörpers an den Protein-DNA-Komplex kommt es zu einem noch langsameren Laufverhalten (*Supershift*, → Abb. 13).

→ Abb. 13:
Prinzip der „Gel-Shifts“ beim EMSA



→ Abb. 13:

Prinzip der „Gel-Shifts“ beim EMSA Die fluoreszenzmarkierte DNA kann aufgrund ihrer Größe am weitesten im elektrischen Feld des Polyacrylamid-Gels laufen. Kommt es zur Bindung eines Transkriptionsfaktors (*Shift*) führt dies zu verlangsamt Laufverhalten. Bei der Bindung eines spezifischen Antikörpers an den Transkriptionsfaktor verlangsamt sich das Laufverhalten abermals und es kommt zu einem *Supershift*.

Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Ulrich Frey

Die Trennung der Oligonukleotide bzw. der erwarteten Komplexe erfolgt nach ihrer Größe in 4 bis 8 % Bisacrylamid Gelen. Die Gele wurden am Tag vor der Gelelektrophorese hergestellt. Die Polymerisation des Gels wurde durch die Zugabe der

Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED) eingeleitet, anschließend wurde ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Gelelektrophorese-Kammer wurde mit $0,5 \times$ TBE-Puffer befüllt. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurde für 10 min ein Pre-Run bei 250 mV zur Äquilibration des Systems durchgeführt. Daraufhin wurden die Kammtaschen mit der Probe beladen und es wurde eine konstante Spannung von 200 mV angelegt. Das Gel lief solange bis sich die Laufmittelfront im unteren Drittel befand.

Bisacrylamid-Gel: $10 \times$ TBE-Puffer, 29:1 Acrylamid/Bisacrylamid (40 %w/v), 40 % Acrylamid (w/v), 80 % Glycerol, Aqua dest, TEMED, 10 %APS.

EMSA-Blotting:

Das EMSA-*Blotting* entspricht vom Prinzip dem Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran. Als Membran diente allerdings eine positiv geladene Nylon-Membran, die in $0,5 \times$ TBE getränkt war. Das *Blotting* fand in einer mit $0,5 \times$ TBE gefüllten *Blotting*-Kammer unter konstantem Stromfluss bei 400 mA für 30 min statt.

Cross-Linking:

Um die Nukleinsäuren auf der Membran zu fixieren, wurden diese auf einen in $2 \times$ SSC getränkten *Whatman*-Filter gelegt, anschließend erfolgte die Fixation im *Auto-UV-Cross-Linker*.

EMSA-Chemilumineszenz:

Zunächst wurde die Nylonmembran kurz in Waschpuffer angefeuchtet, um unspezifische Bindungen zu vermeiden folgte eine 30 minütige Inkubation in Blocking Solution. Anschließend wurde 30 min in der Antikörperlösung inkubiert, so dass die Fab-Fragmente des Antikörpers (anti-Digoxigenin-AP) mit dem Digoxigenin der gelabelten Oligonukleotide binden konnten. Danach wurde in Waschpuffer gewaschen (2×15 min) um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit Detektionspuffer, ein für die alkalische Phosphatase generierter Puffer, erfolgte für 2 bis 5 min. Anschließend wurde die Membran auf eine Folie gelegt und die *CSPD-Working-Solution* für die *Chemiluminescent Detection* aufgetragen. Das CSPD ist ein Substrat der alkalischen Phosphatase, welche das CSPD enzymatisch

dephosphoryliert. Dadurch entsteht ein metastabiles Phenolat Anion, das Licht bei einer Wellenlänge von 477 nm emittiert. Die Nylonmembran wurde mit einer zweiten Folie unter Vermeidung von Luftblasen abgedeckt und für 10 min bei 37 °C inkubiert, um die Chemilumineszenz-Reaktion zu verstärken. Daraufhin wurde die umhüllte Nylonmembran in eine ECL-Expositionskassette platziert. Die emittierten Lichtsignale wurden durch Auflegen eines ECL-Hyperfilms dokumentiert.

Maleic Acid Puffer	: 0,1 M Maleic acid, 0,15 M NaCl; pH 7,5 mit NaOH
Washing Puffer	: 0,1 M Maleic acid, 0,15 M NaCl; pH 7,5; 0,3 % Tween 20
Detection Puffer	: 0,1 M Tris- HCl, 0,1M NaCl; pH 9,5
Blocking Solution(10 ×)	: 10 g Blocking Pulver in 100 ml Maleic Acid
Blocking Solution (1 ×)	: 10 × Blocking Solution 1:10 in Maleic Acid
Antibody Solution	: Anti-Digoxigenin-AP 1:10000 in Blocking Solution
CSPD Working Solution	: Stock-Lösung 1:100 in Detection Puffer

3.2.8.

Statistische Methoden

Alle Ergebnisse sind in der Regel als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Bei einem p-Wert $<0,05$ wurden Unterschiede als signifikant angesehen. Alle statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS 17 und GraphPad Prism 4.0 durchgeführt.

Analyse der Genotyp- und Allelfrequenz (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht):

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht stellt einen Begriff der Populationsgenetik dar. Danach bleibt die Häufigkeit von Homozygoten und Heterozygoten in einer Population konstant, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: große Individuenzahl, Panmixie, keine Selektion, keine Mutation und keine Migration. Sind diese Bedingungen erfüllt, spricht man von einer idealen Population.

In dieser gilt:

Grundformeln: $Af(A)^2 + 2 * Af(A) * Af(a) + Af(a)^2 = 1$ und $Af(A) + Af(a) = 1$

Wobei $Af(A)$ die Allelfrequenz des Allels A und $Af(a)$ die Allelfrequenz des zu A komplementären Allels a ist.

Die Häufigkeiten (h) stehen dann wie folgt mit der Allelfrequenz in Verbindung:

$$\begin{aligned}h(AA) &= Af(A)^2 \\h(Aa) &= 2 \cdot Af(A) \cdot Af(a) \\h(aa) &= Af(a)^2\end{aligned}$$

Die ideale Population existiert in der Natur nicht, sondern ist ein theoretisches Konstrukt. Daher wird von Genotypen-Frequenzen in Studienpopulationen nicht erwartet, dass diese exakt im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vorliegen. Da statistisch signifikante Abweichungen einen wichtigen Hinweis auf Genotypisierungsfehler oder einen vorliegenden Selektions-Bias geben, werden Genotypenverteilungen trotzdem mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verglichen. Die Haplotypen-Analyse und die Kontrolle auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurden mit dem Programm *HaploView 4.1* ausgeführt. Dieses Programm analysiert die mögliche Kopplung zweier allelischer Marker durch Vergleich der beobachteten mit der erwarteten Genotyp-Verteilung. So können die geschätzten Haplotypfrequenzen und der geschätzte Kopplungsungleichgewichtskoeffizient D bestimmt werden. D wird als D' ausgedrückt, welches den Wert von D als den Prozentwert des maximalen berechneten Wertes der beobachteten Allelfrequenz angibt. Werte von D' liegen zwischen -1 und +1. Ein D' Wert von 1 zeigt ein komplettes Kopplungsungleichgewicht an, während ein Wert von 0 ein komplettes Kopplungsgleichgewicht bedeutet. Allele verschiedener SNPs treten, wenn sie im vollständigen Kopplungsungleichgewicht liegen, immer in festen Kombinationen auf. Diese angezeigte Abhängigkeit muss allerdings nicht linear sein, so dass ein Allel eines SNPs durchaus mit zwei Allelen eines anderen SNPs vorkommen kann. Um die lineare Abhängigkeit zu überprüfen, wird der Korrelationskoeffizient r^2 zweier SNPs mit demselben Programm bestimmt. Der Korrelationskoeffizient r kann ebenfalls Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Ein r^2 von 1 zeigt eine vollständige lineare Abhängigkeit zweier SNPs an. Das bedeutet, dass ein bestimmtes Allel eines SNPs immer mit nur genau einem Allel eines anderen vorkommt.

Bonferroni-Korrektur:

Bei der Durchführung mehrerer statistischer Signifikanztests mit den gleichen Daten kann die Bonferroni-Korrektur angewandt werden, um es einem einzel-

nen Test zu erschweren, statistisch signifikant zu sein. Die Bonferroni-Korrektur neutralisiert die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen. Üblicherweise wird die Division des Alpha-Niveaus (0,05 oder 0,01) durch die Zahl der durchgeführten Tests vorgenommen. Bei fünf Tests für einzelne Korrelationen aus der gleichen Korrelationsmatrix, wäre das Bonferroni-korrigierte Signifikanzniveau für eine Korrelation: $0,05 / 5 = 0,01$. Jeder Test, der einen p-Wert kleiner als 0,01 ergibt, gilt als statistisch signifikant. Korrelationen mit einem Wahrscheinlichkeitswert größer als 0,01 gelten als nicht-signifikant.

Statistische Methode zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression bei der Real-time PCR:

Bei diesem Verfahren wird die mRNA-Expression des Gens von Interesse (Zielgen) mit der eines nicht regulierten *Housekeeping*-Gens (β -Aktin) relativiert. Es wird also nicht die absolute Expression quantifiziert, sondern die Expression wird auf das ubiquitär und homogen exprimierte β -Aktin bezogen. Dies verhindert fehlerhafte Quantifizierungen durch Gewebe- und Matrixeffekte, Unterschiede in der RNA Extraktion sowie Fehler bei der RT-Reaktion innerhalb der Probe¹⁵⁰. Die Formel zur relativen Quantifizierung lautet: $2^{-\Delta Ct}$. Dabei muss von einer Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus ausgegangen werden¹⁵¹. Es wird der Ct-Wert des Referenzgens (β -Aktin) von dem des Zielgens subtrahiert ($2^{-Ct \text{ Zielgen} - Ct \beta\text{-Aktin}}$).

Statistische Methoden zur Auswertung der Korrelation zwischen endogener RNA-Konzentration und mikroRNA-Expression:

Quantitative Unterschiede wurden mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA ermittelt. Der Test einfaktorielle ANOVA führt eine einfaktorielle Varianzanalyse für eine quantitative abhängige Variable mit einer einzelnen (unabhängigen) Faktorvariablen durch. Mit der Varianzanalyse wird die Hypothese überprüft, dass mehrere Mittelwerte gleich sind. Dieses Verfahren ist eine Erweiterung des t-Tests bei zwei Stichproben.

Statistische Methoden zur Auswertung der Dual-Glo-Luciferase-Assays

Haplotypabhängige Unterschiede bei der Promotor-Aktivität wurden zum Vergleich von drei Haplotypen mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA durchgeführt. Um die Signifikanz zweier Haplotypen untereinander zu überprüfen, wurde der unpaired t-Test verwendet.

4. ERGEBNISSE

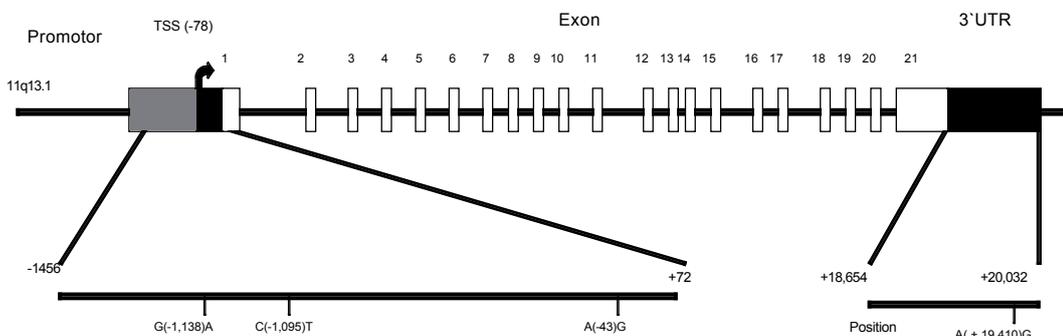
4.1.

Identifizierung und Lokalisation der *GRK2*-Promotor- und 3' UTR-SNPs

Bei der Sequenzierung des *GRK2*- Promotors konnten drei SNPs identifiziert werden: G(-1,138)A, C(-1,095)T und A(-43)G. Der in dieser Arbeit neu identifizierte SNP A(-43)G befindet sich laut Datenbank der University of Florida (→ CHIP Bioinformatics Tools, SNPper, www.snpper.chip.org) im Exon 1 des *GRK2*-Gens und ist im Gegensatz zu den erstgenannten, identifizierten Promotor-SNPs noch nicht beschrieben. Die Sequenzierung der 3' UTR ergab die Identifikation des A(+19,410)G-SNP, der ebenfalls noch nicht in dieser Datenbank erfasst ist (→ Abb. 14).

→ Abb. 14:

Lokalisation der untersuchten SNPs im *GRK2*-Gen



Zur Untersuchung der Häufigkeiten der SNPs wurde die Allelfrequenz bei verschiedenen Ethnien ermittelt und das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht berechnet.

→ Tab. 7:

Genotypen und Allelfrequenz der GRK2-Promotor- und 3`UTR-SNPs bei verschiedenen Ethnien

G(-1,138)A rs10791901	C(-1,095)T rs11605263	A(-43)G Neu	A(+19,410)G Neu	MAF
0,01	0,04	0,02	0,01	Kaukasier n = 615
0,08	–	0	0	Afrikaner n = 355
0,01	–	0,03	0,04	Chinesen n = 305

→ Tab. 7:

MAF= Minor Allel Frequenz

Die angegebenen Frequenzen beziehen sich auf die jeweilige Minorallelfrequenz. Die zu Anfang stehende Base gibt den bei der Sequenzierung identifizierten „Wildtyp“ der Sequenz an, die nach der Lokalisation (z.B. -1,138) angegebene Base das beobachtete Minorallel. Die Genotypenverteilung liegt bei allen beschriebenen SNPs im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die Häufigkeit der SNPs zeigt sich bei den verschiedenen Ethnien als sehr gering, mit lediglich 0,7 % bis 8 %. Aufgrund des seltenen Auftretens der SNPs wurden keine weiteren Kopplungsanalysen durchgeführt.

4.2.

Untersuchungen zum Proteinbindungsverhalten des *GRK2*-Promotors und der 3`UTR

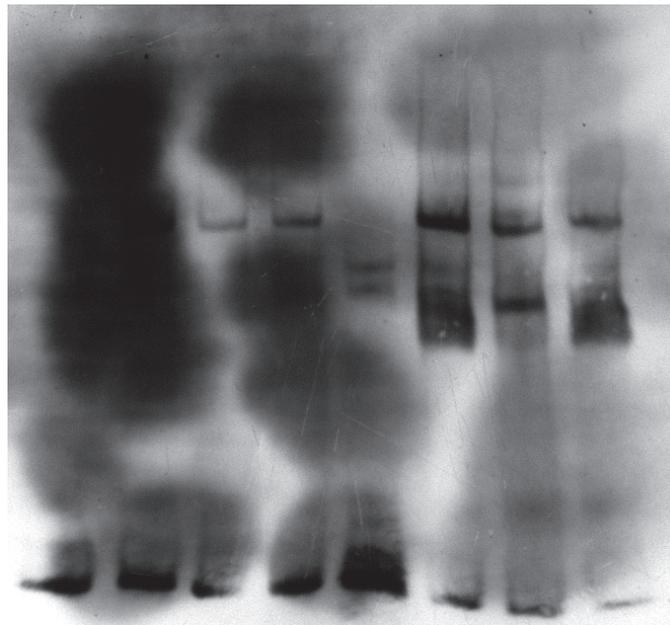
Trotz des seltenen Auftretens der erfassten SNPs wurde die Bindung von Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zellsystemen getestet, um Aussagen über die Bedeutung der SNPs treffen zu können. Die Untersuchungen erfolgten mittels EMSA. Alle verwandten Sonden sind im Anhang unter „Primer zur Untersuchung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an *GRK2*“ aufgeführt (→ Abb. 15).

Allelspezifische Sonden wurden zunächst mit HEK293-Zellkernextrakten inkubiert. Zusätzlich wurde die vierte bzw. achte Spur mit einer sog. Gegenkompetition beladen. Dies soll bei spezifischen Bindungen die Abhängigkeit zum Genotyp verifizie-

→ Abb. 15:

EMSA des A(-1138)G-SNP

-1,278 caggaaggg agctccaag agtgctggcc agggacctgg gtctatgagc
 -1,228 tgggtggggg gtggggtgg gtgcaggga cttgatcctg agtgggcctt
 -1,178 ctgcggccag gattggtct agagtaggag gggtgggatc agggatgggg [rs10791901](#)
 -1,128 gaagcctga actgcgctgc agttgcagg tcccaggttc tgggtgacct [rs11605263](#)
 -1,078 actaaggatt ctgggtccag tgtgggtccc aggttagacg tcctagtctt
 -1,028 gagtccgtgt ccacagtctt ggggtgtgag tctaggacag tgatctggag [rs12286664](#)



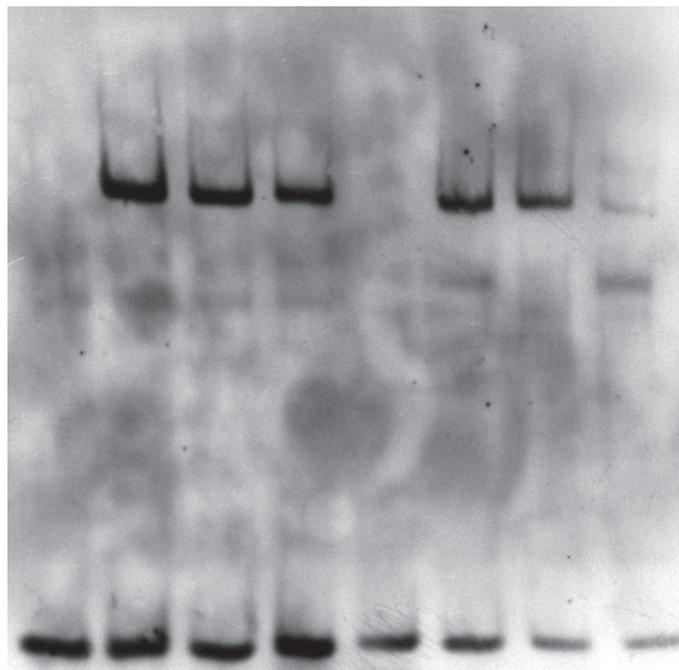
Labeled Oligonucleotid (1:10)	AA	AA	AA	AA	GG	GG	GG	GG
Unlabeled Oligonucleotid			124 fach AA	124 fach GG			124 fach GG	124 fach AA
HEK293-ZKE		+	+	+		+	+	+

ren. Bei einer Spezifität zum A-Allel würde bei der Kompetition AA-Protein von ungelabeltem Oligonucleotid abgefangen und es wäre keine spezifische Bande sichtbar. Die Gegenkompetition würde dagegen eine A-allel-spezifische Bande wieder sichtbar machen, da die GG-Kompetition kein Protein abfangen würde. Würde Protein sowohl an das A-Allel, als auch an das G-Allel binden, würde bei beiden Kompetitionen keine Bande zu erkennen sein. In diesem EMSA sind für die generierten Sonden keine spezifischen Banden vorhanden, so dass keine spezifische Bindung von Protein aus HEK293-Zellkernextrakten erfolgt ist (→ Abb. 15). Zusätzlich wurden EMSA mit A 10-Zellkernextrakten inkubiert, die jedoch ebenfalls keine spezifischen Banden erkennen ließen und in dieser Arbeit daher nicht aufgeführt sind.

→ Abb. 16:

EMSA des C(-1095)T-SNP

-1,228 tggttgggg ggggggttg gtcaggga ctgacctg agtggcctt
 -1,178 ctgcggccag gattggtct agagtaggag gggtgggatc agggatgggg [rs10791901](#)
 -1,128 gaagcctga actgctgctc agttgcagg tccagggtc tgggtgacct [rs11605263](#)
 -1,078 actaaggatt ctgggtccag tgtgggtccc aggttagacg tcctagtctt
 -1,028 gagtccgtgt ccacagtctt ggggttgag tctaggacag tgatctggag [rs12286664](#)



Labeled Oligonukleotid (1:10)	CC	CC	CC	CC	TT	TT	TT	TT
Unlabeled Oligonukleotid			124 fach CC	124 fach TT			124 fach TT	124 fach CC
HEK293-ZKE		+	+	+		+	+	+

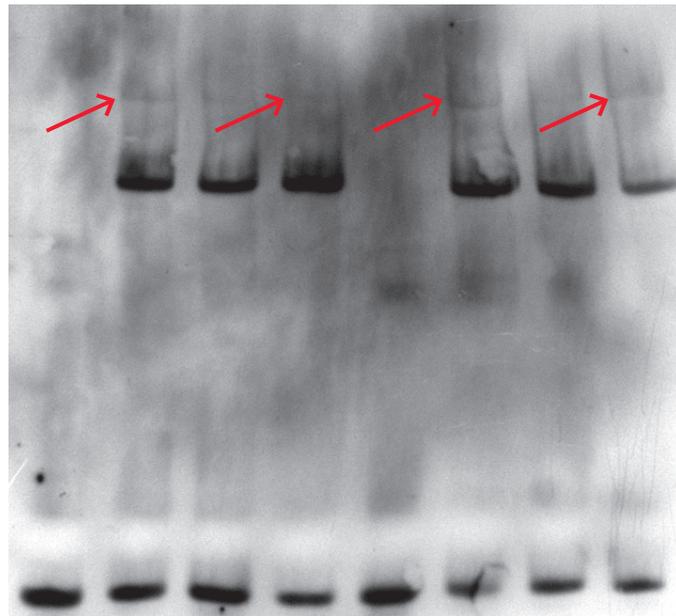
Allelspezifische Sonden des SNP C(-1095)T wurden zunächst mit HEK293-Zellkernextrakten inkubiert (→ Abb. 16). Außerdem wurde die Bindung von A10-Zellkernextrakten getestet (nicht aufgeführt). Sowohl bei HEK293, als auch A10-Zellkernextrakten konnte keine spezifische DNA-Protein-Bindung beobachtet werden (→ Abb. 16).

Bei der Inkubation der Sonden des A(-43)G-SNP mit HEK293-Zellkernextrakten konnten jeweils spezifische Banden für das A-Allel, als auch für das G-Allel de-

→ Abb. 17:

EMSA des A(-43)G-SNP

128 agcagggcca ggcgggaggc gtcggcgccc gaggccgagc gagccgcggc
 -78 cgggcccggc cgagcggcga gcgagcagga gcggcggcgg cggcggcggc Exon 1
 -28 ggcgggagga ggcagcgccg ccgccaagAT GGCGGACCTG GAGGCGGTGC



Labeled Oligonukleotid (1:10)	AA	AA	AA	AA	GG	GG	GG	GG
Unlabeled Oligonukleotid			124 fach AA	124 fach GG			124 fach GG	124 fach AA
HEK293-ZKE		+	+	+		+	+	+

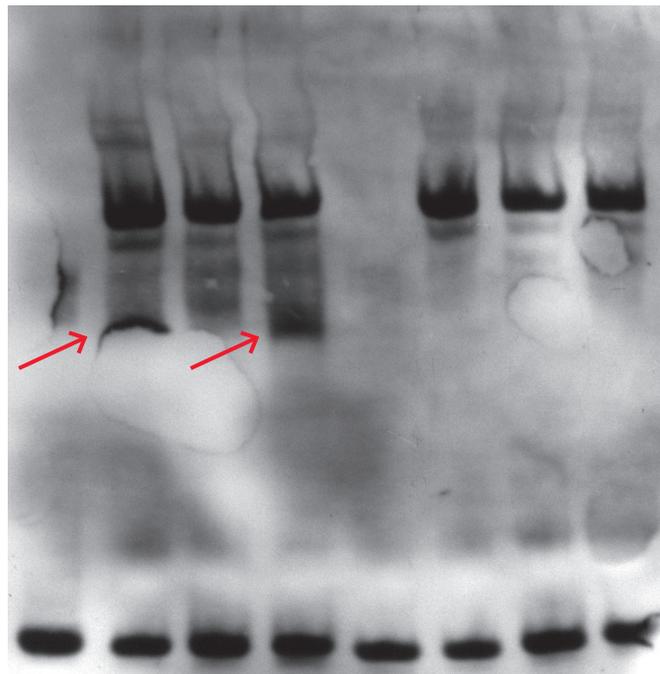
tektiert werden. Diese spezifischen Banden befinden sich auf gleicher Höhe, was für die Bindung eines gleich oder ähnlich großen Protein spricht. Darüber hinaus lässt sich erkennen, dass die Bande des G-Allels ungleich stärker sichtbar ist als die des A-Allels. Beide konnten vom Gegenallel kompetitiert werden (→ Abb. 17). Bei der Testung mit A10-Zellkernextrakten konnte keine spezifische DNA-Protein-Bindung beobachtet werden (nicht aufgeführt).

Dieser EMSA zur Untersuchung des 3'UTR-SNP zeigt deutliche Banden unterhalb der unspezifischen Banden der A-Allel Sonde, die in der Gegenkompetition

→ Abb. 18:

EMSA des A(+19,410)G-SNP

+19,273 cctgtgcctt tattcaggaa aagcctctgt gtcactggct gcctccactc
 +19,323 ccacttcctt gacactgcgg ggcttggctg agagagtggc attggcagca
 +19,373 ggtgctgcta ccctccctgc tgtcccctct tgcccc**aa**cc cccagcaccc
 +19,423 gggctcaggg accacagcaa ggcacctgca ggttgggcca tactgcctc
 +19,473 gcctggcctg aggtctcgt gatgctgggc tgggtgcgac cccatctgcc



Labeled Oligonukleotid (1:10)	AA	AA	AA	AA	GG	GG	GG	GG
Unlabeled Oligonukleotid			124 fach AA	124 fach GG			124 fach GG	124 fach AA
HASM-ZKE		+	+	+		+	+	+

ebenfalls vorhanden ist. Dies spricht für die Spezifität der Bindung. Die Sonde des G-Allels zeigt keinerlei spezifische Bande. Die Sonden wurden mit HASM-Zellkernextrakten inkubiert (→ Abb. 18). Zusätzlich wurde der EMSA mit HEK293-Zellkernextrakten durchgeführt (nicht aufgeführt). Hier zeigten sich keine spezifischen Proteinbindungen.

4.3.

***In-silico*-Analyse potentieller Proteinbindungen an GRK2-Promotorsequenzen und der 3'UTR-Sequenz**

Es wurden lediglich Untersuchungen zu den Sequenzen durchgeführt, die im EMSA eine spezifische Bindung von Protein zeigten. Diese beinhalten die Oligonukleotid-Sequenz des A(-43)G-Promotor-SNP und des A(+19,410)G-SNP in der 3'UTR des *GRK2*-Gens. Die Auswertung erfolgte über die Programme *MAT-inspector* und *Alibaba2* (→ Genomatix, www.genomatix.de). Das Ergebnis der A(-43)G-SNP-Sequenz ergab für das Programm *MAT-inspector* sowohl für den GG- als auch für den AA-Genotyp eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor EGR1. Die Analyse des *AliBaba2* Programms zeigte potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, WT1, und AP-2alpha. Zusätzlich zeigten sich Genotyp-abhängige Unterschiede, wobei die Sequenz des GG-Genotyps eine potentielle Bindungsstelle für Krox20, die AA-Sequenz eine für Adf-1 aufweist. Weiterhin fällt auf, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 vier Bindungsstellen in der Sequenz besitzt.

Die Analyse für den 3'UTR-SNP A(+19,410)G mittels *MAT-inspector* (→ Abb.30, A) ergab bei beiden Genotyp-Varianten die potentielle Bindung der Transkriptionsfaktoren MZF1, CCAAT, MEF3 und AML1. Zusätzlich wird ein repressiv wirkender Transkriptionsfaktor, *Zinc finger protein isulinoma associated 1*, angezeigt. In der Analyse zeigt sich jedoch auch ein Unterschied zwischen Genotypen. Während für die Sequenz des AA-Genotyps eine mögliche Bindung des *Ras-responsiv element binding protein 1* postuliert wird, besteht bei der GG-Variante die potentielle Bindungsstelle für das *stimulating protein 1*. Die *AliBaba2* Auswertung dagegen beschreibt eine mögliche Bindung von Sp1 und C/EBPalpha sowohl für den Genotyp AA als auch GG. Die Anzahl der Bindungsstellen für Sp1 beträgt im Falle des AA-Genotyps zwei Bindungsstellen, der GG-Genotyp weist dagegen drei Bindungsstellen auf. Ferner besteht für den AA-Genotyp eine mögliche Bindungsstelle für AP-2alpha.

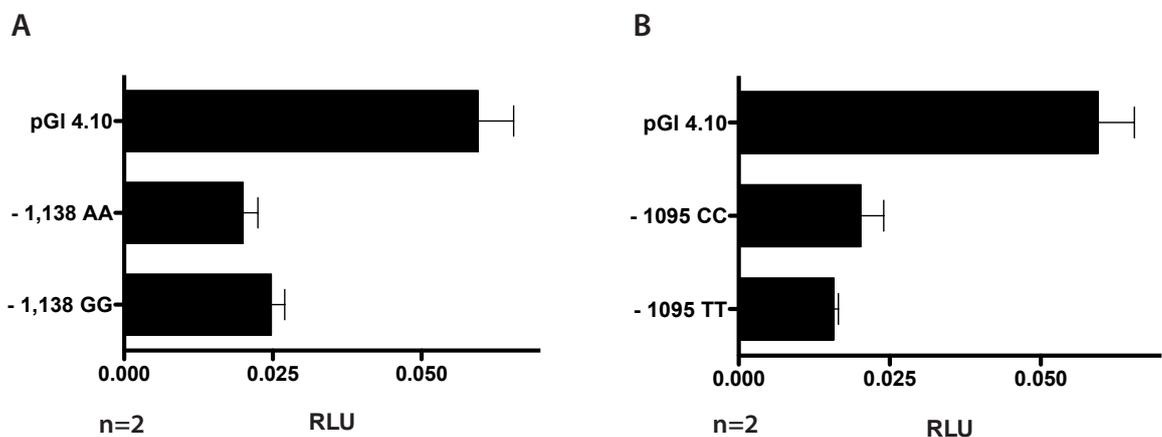
4.4.

Funktionelle Untersuchung der Promotor- und 3'UTR-SNPs des GRK2-Gens mittels Luciferase-Assay

Da der Promotor des *GRK2*-Gens, wie in der Einleitung beschrieben, bereits von einer anderen Arbeitsgruppe charakterisiert wurde, wurde hier der Einfluss der identifizierten SNPs auf die Gesamt-Promotor-Aktivität getestet. Dazu wurden Konstrukte generiert, die das entsprechende Allel des SNP in der Promotorsequenz enthalten und in den Reportervektor *pGl 4.10* kloniert. Diese wurden anschließend in einem *Luciferase-Assay* auf ihre Aktivität untersucht. Die 3'UTR des Gens wurde in den *pMIR-Report-Luciferase-Vektor* kloniert und auf gleiche Weise getestet.

→ Abb. 19:

Funktionelle Untersuchung des A(-1138)G und C(-1095)T-SNP



→ Abb. 19:

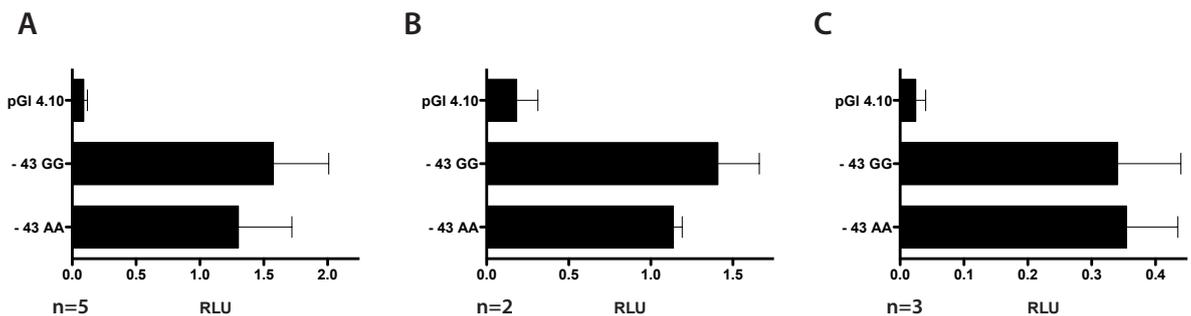
Funktionelle Untersuchung des A(-1138)G und C(-1095)T-SNP

unktionelle Untersuchung des A(-1138)G- (Abb. A) und C(-1095)T- (Abb. B) SNP im HEK293-Zellsystem 24 Stunden nach Transfektion

Die Promotor-Aktivitäten liegen bei den SNPs A(-1138)G und C(-1095)T unter der des Kontrollvektors und zeigen keine signifikanten, Genotyp-abhängigen Unterschiede (→ Abb. 19, A und B).

→ Abb. 20:

Funktionelle Untersuchung des A(-43)G-SNP



→ Abb. 20:

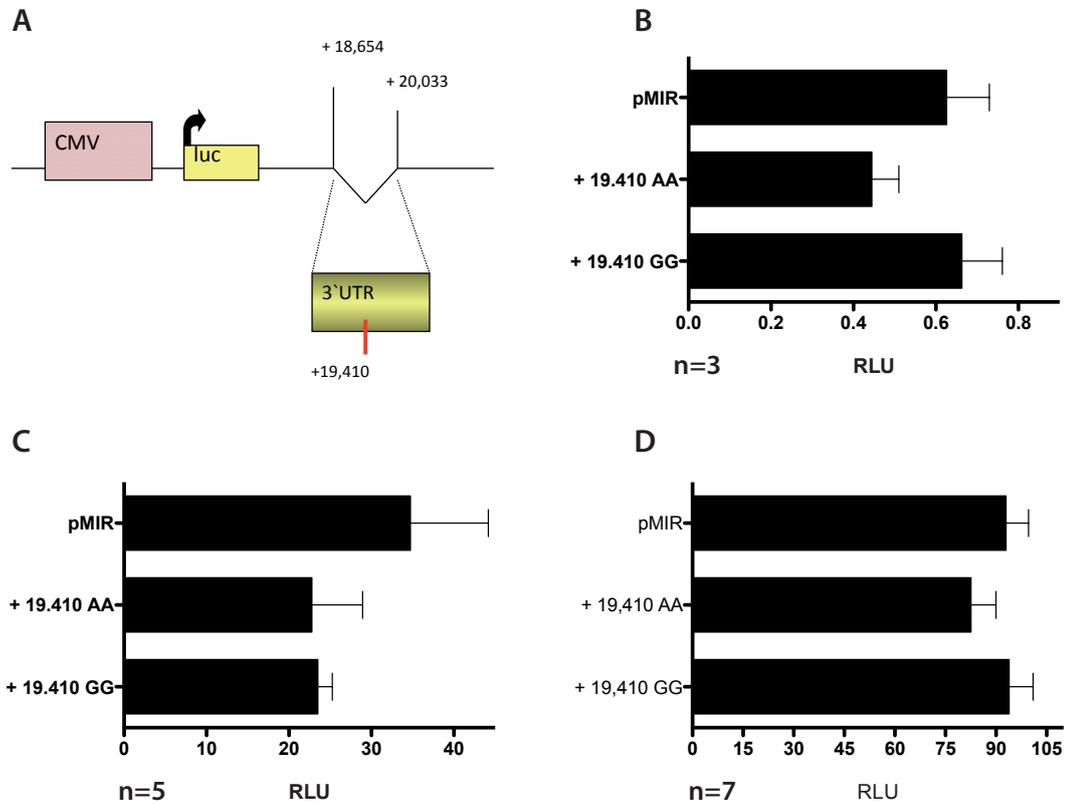
Funktionelle Untersuchung des A(-43)G-SNP im HEK293-Zellsystem 6 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach Transfektion und 24 Stunden nach Transfektion im A10-Zellsystem (C).

Die Messungen der Aktivität des A(-43)G-SNP in HEK293-Zellen zeigen sowohl nach 6 Stunden, als auch nach 24 Stunden keine signifikanten Unterschiede (→ Abb.20, A und B). Jedoch weist die Messung nach 24 Stunden auf eine höhere Aktivität des G-Allel-Konstrukts hin (→ Abb. 20, B). Die ermittelte Aktivität der Konstrukte im A10-Zellsystem zeigt sich zwischen A- und G-Allel-Konstrukt als nahezu identisch (→ Abb. 20, C). Alle Konstrukt-Aktivitäten liegen im Vergleich zum Kontrollvektor um ein Vielfaches höher.

Die Transfektion der in Abbildung 21 A dargestellten Konstrukte erfolgte zunächst im A10-Zellsystem, da in vorangegangenen Untersuchungen zum Proteinbindungsverhalten eine Bindung von Zellkernextrakten aus Aortenzellen des Menschen (HASM-Zellen) für den AA-Genotyp bereits gezeigt werden konnte.

→ Abb. 21:

Funktionelle Untersuchung der 3' UTR des *GRK2*-Gens mittels *Luciferase-Assay*



→ Abb. 21:

Funktionelle Untersuchung der 3' UTR des *GRK2*-Gens mittels *Luciferase-Assay*

Abb. A: Schematische Darstellung des pMIR Report Luciferase Vektors mit Lokalisation der klonierten 3' UTR des *GRK2*-Gens sowie des SNP, B: gemessene Aktivitäten der 3' UTR-Konstrukte und des pMIR im A10-Zellsystem nach 24 Stunden, C, D: gemessene Aktivitäten der Konstrukte im HEK293-Zellsystem nach 6 Stunden (C), nach 24 Stunden (D).

Bei dieser funktionellen Untersuchung in glatten Muskelzellen der Aorta der Ratte stellt sich die Aktivität des GG-Genotyps als vergleichbar mit der des *pMIR*-Vektors dar. Die Aktivität des AA-Genotyps dagegen lässt eine niedrigere Aktivität sowohl im Vergleich zum *pMIR*-Vektor, als auch zum GG-Genotyp vermuten, zeigt sich jedoch nicht als signifikant (→ Abb. 21, B). Um die Ergebnisse der EMSA-Untersuchungen zu verifizieren, wurden selbige Konstrukte im HEK293-Zellsystem untersucht. Wie auch im EMSA zeigen sich hier keine Genotyp-abhängigen, funktionellen Unterschiede (→ Abb. 21, C und D). Jedoch fällt auf, dass die Aktivität beider Konstrukte 6 Stunden nach Transfektion deutlich niedriger ist als die des *pMIR*-Kontrollvektors (→ Abb. 21, C). Dagegen sind die Aktivitäten nach 24 Stunden einander angeglichen (→ Abb. 21, D).

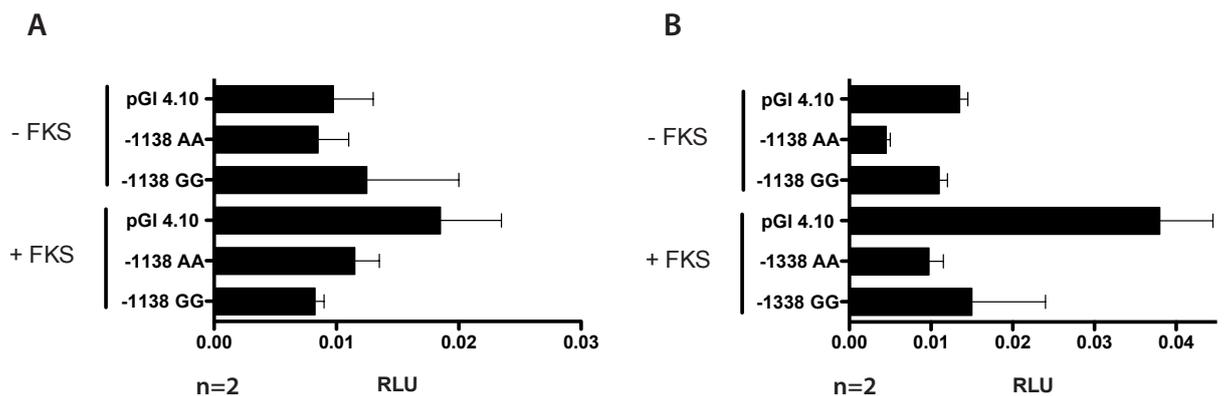
4.4.1.

Funktionelle Untersuchung der GRK2-SNPs unter Serumstimulation

Ziel der Serumstimulation ist es die Konstrukt-Aktivität unter Bedingungen zu messen, in denen der Zellstoffwechsel durch bestimmte Stimuli verändert wird. In diesem Fall wurde im HEK293-Zellsystem mit FKS stimuliert bzw. FKS entzogen.

→ Abb. 22:

Funktionelle Untersuchung des A(-1138)G-SNP unter Serumstimulation

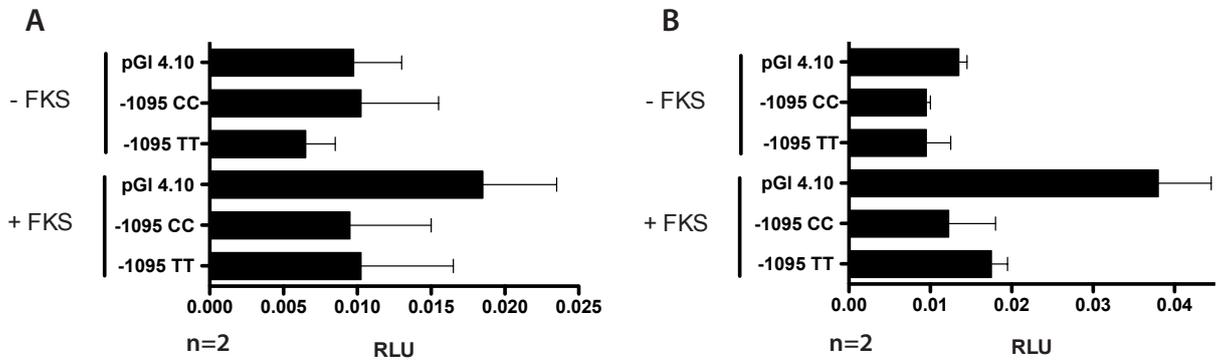


→ Abb. 22:

funktionelle Untersuchung des A(-1138)G-SNP 6 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach Transfektion unter Serumstimulation im HEK293-Zellsystem.

Die Untersuchung der Promotor SNPs A(-1138)G und C(-1095)T unter Serumstimulation ergaben ähnliche Ergebnisse wie unter *steady-state*-Bedingungen. Die Aktivität der Konstrukte lag sowohl 6 Stunden (→ Abb. 22 und 23, A), als auch 24 Stunden (→ Abb. 22 und 23, B) nach Transfektion unter der des Kontrollvektors. Genotyp-abhängige Unterschiede sind ebenfalls nicht zu erkennen.

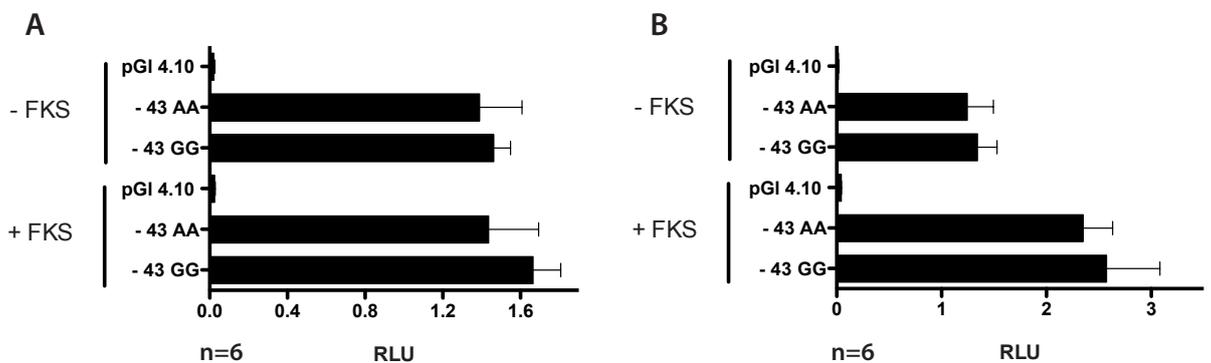
→ Abb. 23:
Funktionelle Untersuchung des C(-1095)T-SNP unter Serumstimulation



→ Abb. 23:
Funktionelle Untersuchung des C(-1095)T-SNP 6 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach Transfektion unter Serumstimulation im HEK293-Zellsystem.

Ein Vergleich der Aktivität der A(-43)G-Konstrukte zwischen 6 Stunden (→ Abb. 24, A) und 24 Stunden (→ Abb. 24, B) nach Transfektion zeigt zunächst eine Zunahme der Aktivität unter Serumstimulation, wohingegen die Aktivität unter Serumentzug gleich bleibend ist. Es sind keine signifikanten Genotyp-abhängigen Unterschiede zu erkennen.

→ Abb. 24:
Funktionelle Untersuchung des A(-43)G-SNP unter Serumstimulation

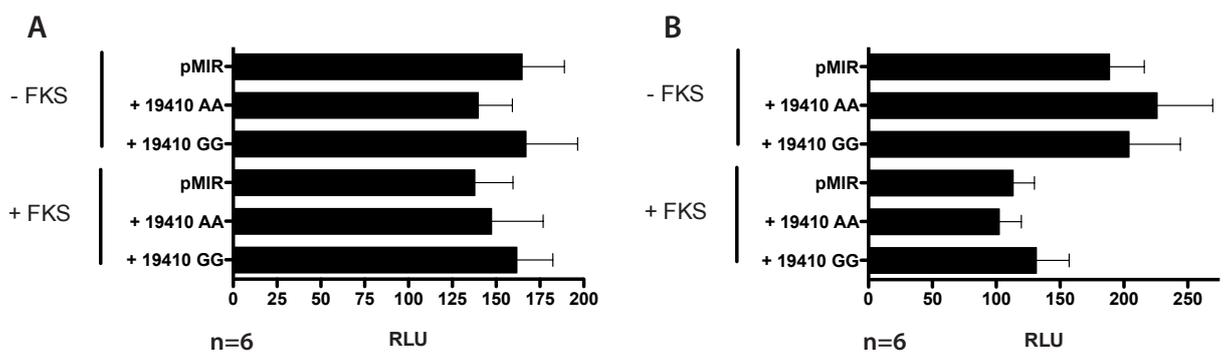


→ Abb. 24:
Funktionelle Untersuchung des G(-43)A-SNP 6 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach Transfektion unter Serumstimulation im HEK293-Zellsystem.

Bei der Betrachtung des A(+19,410)G-SNP der 3`UTR im *Luciferase-Assay* fällt auf, dass lediglich der AA-Genotyp 6 Stunden nach Transfektion und unter Serumentzug unter der *pMIR*-Aktivität liegt (→ Abb. 25, A). Unter Serumstimulation (→ Abb. 25, A) und 24 Stunden nach Transfektion (→ Abb. 25, B) zeigt sich die Aktivität der Konstrukte höher oder gleich der *pMIR*-Aktivität. Zudem kommt es lediglich unter Serumentzug zu einer Zunahme der Aktivität im Zeitverlauf der Messung. Die Aktivität unter Serumstimulation ist im Zeitverlauf in etwa gleich bleibend.

→ Abb. 25:

Funktionelle Untersuchung des A(+19,410)G-SNP unter Serumstimulation



→ Abb. 25:

Funktionelle Untersuchung des A(+19,410)G-SNP 6 Stunden (A) und 24 Stunden (B) nach Transfektion unter Serumstimulation im HEK293-Zellsystem.

4.5.

Untersuchungen zur allgemeinen *GRK5*-Promotorcharakterisierung

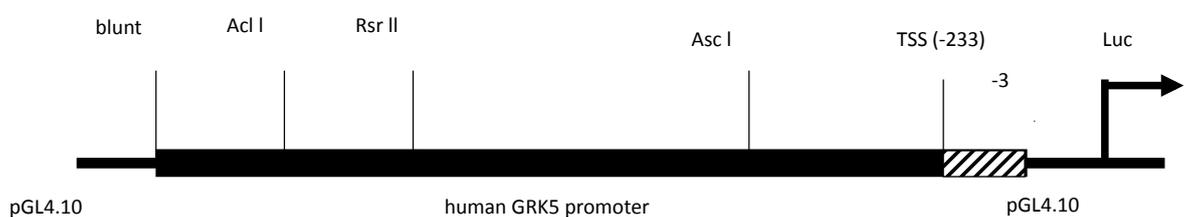
Ziel der Untersuchungen zum *GRK5*-Promotor war es zunächst eine allgemeine Charakterisierung des Promotors vorzunehmen, um Aussagen über Bereiche unterschiedlicher Aktivität treffen zu können. Um den Abschnitt der Sequenz mit höchster Aktivität eingrenzen zu können, wurden Deletionskonstrukte erstellt, deren Aktivität in einem *Luciferase-Assay* untersucht wurde. Dabei wurden in verschiedenen Zellsystemen untersucht, um Aktivitätsänderungen unter ungleichen endogenen Bedingungen zu erfassen.

4.5.1.

Untersuchung der *GRK5*-Promotor-Aktivität anhand von Deletionskonstrukten

→ Abb. 26:

Schematische Darstellung des *GRK5*-Promotors im pGI 4.10-Vektor



→ Abb. 26:

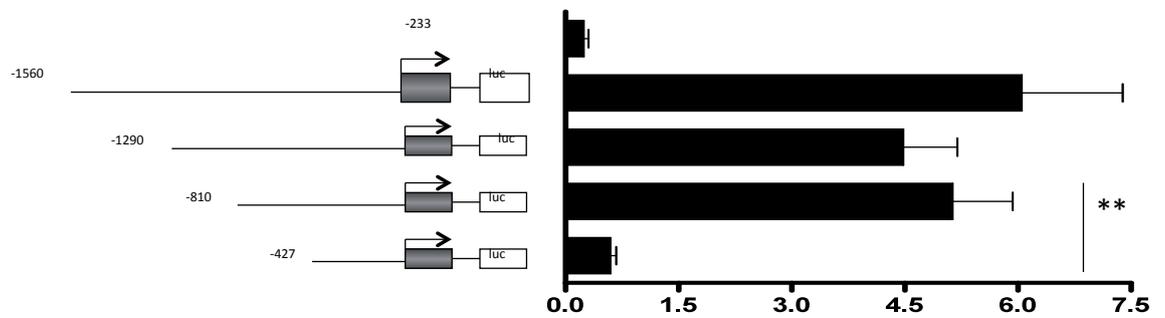
Schematische Darstellung des *GRK5*-Promotors im pGI 4.10-Vektor

die eingezeichneten Schnittstellen (z.B. blunt oder RsrII) geben die Größenverhältnisse der Deletionskonstrukte an, die in *Sense*-Richtung vor dem Luciferase (Luc)-Gen des Vektors liegen.

Die Messungen der *GRK5*-Promotor-Aktivität in den Zellsystemen HEK293 und A10 ergab zunächst eine bis zu 6-fach höhere Aktivität der Konstrukte im A10-Zellsystem (vgl. Abb. 27 und 28). Des Weiteren fiel eine deutliche Abnahme der Aktivität des -427 Konstrukts im Vergleich zu größeren Konstrukten auf. Dieser Aktivitätsabfall stellt sich im A10-Zellsystem als hoch signifikant ($p=0,0035$), im HEK293-System als signifikant ($p=0,0275$) niedriger dar. Die Konstrukte -1560, -1290 und -810 zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Aktivität. Diese Daten beschreiben den Sequenzabschnitt zwischen -810 und -427 als besonders bedeutend für die Promotor-Aktivität.

→ Abb. 27:

Ergebnis des *Luciferase-Assays* der GRK5-Delektionskonstrukte



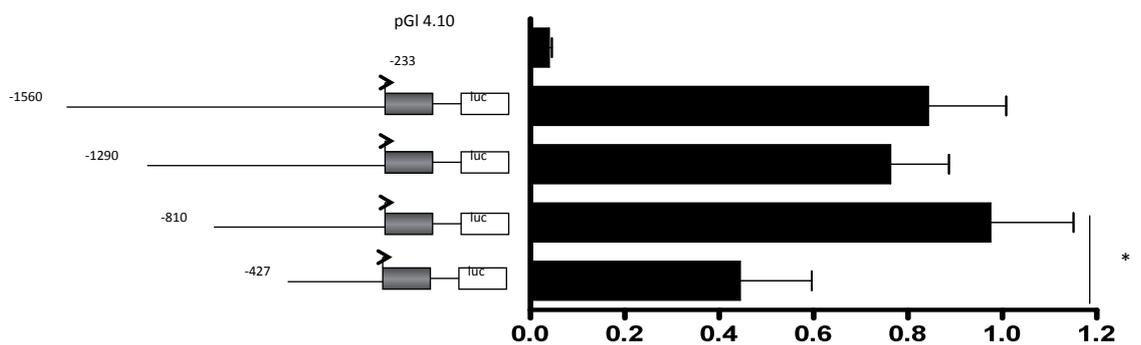
n= 5

→ Abb. 27:

Ergebnis des *Luciferase-Assays* der GRK5-Deletionskonstrukte im A10-Zellsystem nach 24 Stunden Messung. Die Aktivität der Konstrukte ist in *Relative Light Units (RLU)* angegeben.

→ Abb. 28:

Ergebnis des *Luciferase-Assays* der GRK5-Deletionskonstrukte



n= 4

→ Abb. 28:

Ergebnis des *Luciferase-Assays* der GRK5-Deletionskonstrukte im HEK293-Zellsystem nach 24 Stunden-Messung. Die Aktivität der Konstrukte ist in *Relative Light Units (RLU)* angegeben.

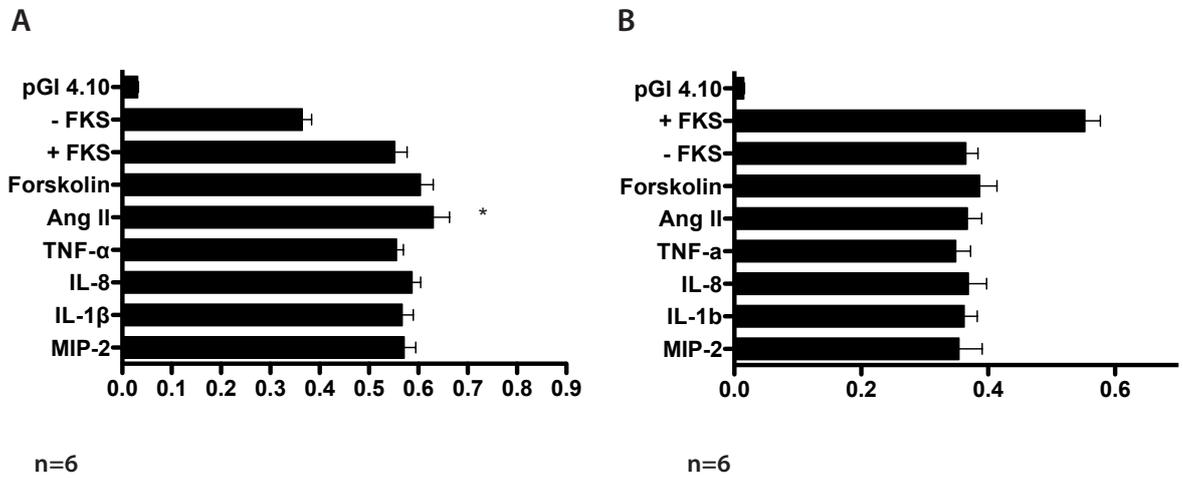
4.5.2.

Bestimmung der GRK5-Promotor-Aktivität unter Substanzstimulation

Hier soll die Beeinflussung der GRK5-Promotor-Aktivität durch spezifische Substanzen untersucht werden. Die Generierung von Deletionskonstrukten dient der Identifizierung von Promotorabschnitten besonderer Aktivität. Der Promotor kann so in Sequenzabschnitte unterteilt werden, die auf eine mögliche Bindung von Transkriptionsfaktoren schließen lassen. Hier wurde ebenfalls im A10- und HEK293- Zellsystem getestet. Die Stimulation des GRK5-Promotors erfolgte jeweils unter Vorhandensein von Serum (FKS) und unter Serumentzug (→ Abb. 29, A und B). Die Substanzen zur Stimulation sind im Abschnitt Material und Methoden, 3.2.6. *Luciferase-Assay*, Stimulation von GRK5-Konstrukten zusammengefasst. Ein Vergleich der Grundaktivität zwischen Serum und Serum-freien Bedingungen zeigt eine um 50 % niedrigere Aktivität der Konstrukte unter Serum-freien Bedingungen. Des Weiteren fällt auf, dass die Stimulation mit Forskolin (n.s.) und Angiotensin II ($p=0,0005$) einen Anstieg der Basal-Aktivität unter Serum Bedingungen zur Folge hat (→ Abb 29, A). Die Stimulation mit weiteren besagten Substanzen zeigt weder unter Serum, noch unter Serum-freien Bedingungen eine signifikante Änderung der Grundaktivität (→ Abb. 29, A und B). Alle Untersuchungen zur Substanzstimulation wurden mit den Konstrukten ATT, GCC und ACC des GRK5-Promotors durchgeführt.

→ Abb. 29:

Luciferase-Assay des *GRK5*-Promotors unter Substanzstimulation im HEK293-Zellsystem



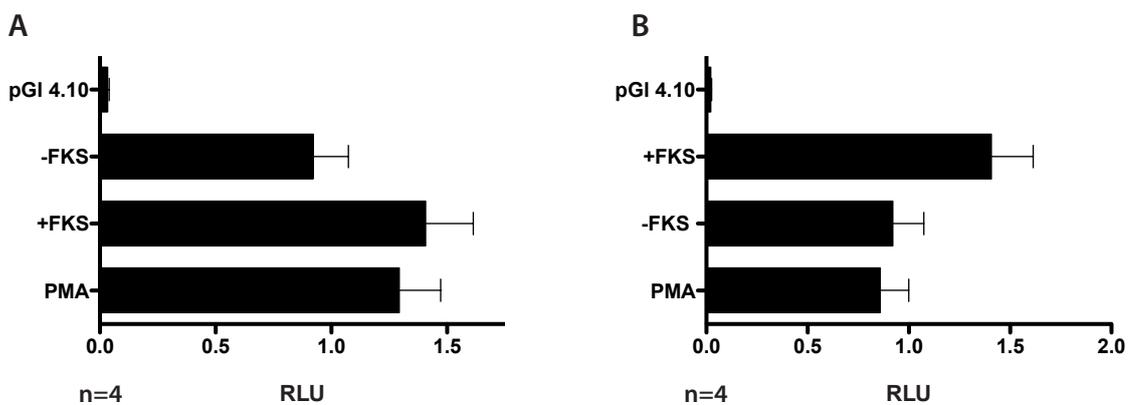
→ Abb. 29:

Funktionelle Untersuchung der Gesamt-Promotor-Aktivität des *GRK5*-Gens mit Substanzstimulation unter Serumstimulation (A) und unter Serumentzug (B). Die Messung erfolgte im HEK293-Zellsystem 6 Stunden nach Stimulation.

Die Stimulation mit PMA (Phorbol12-myristate-13-acetate) lässt eine höhere Grundaktivität unter Zugabe von FKS erkennen (→vgl. Abb. 30, A und B). PMA besitzt keine stimulierende Wirkung auf die hier untersuchte Promotorsequenz, sondern tendiert eher zu einer Hemmung der Aktivität, die sich jedoch als nicht signifikant darstellt.

→ Abb. 30:

Luciferase-Assay des *GRK5*-Promotors unter PMA Stimulation im HEK293-Zellsystem



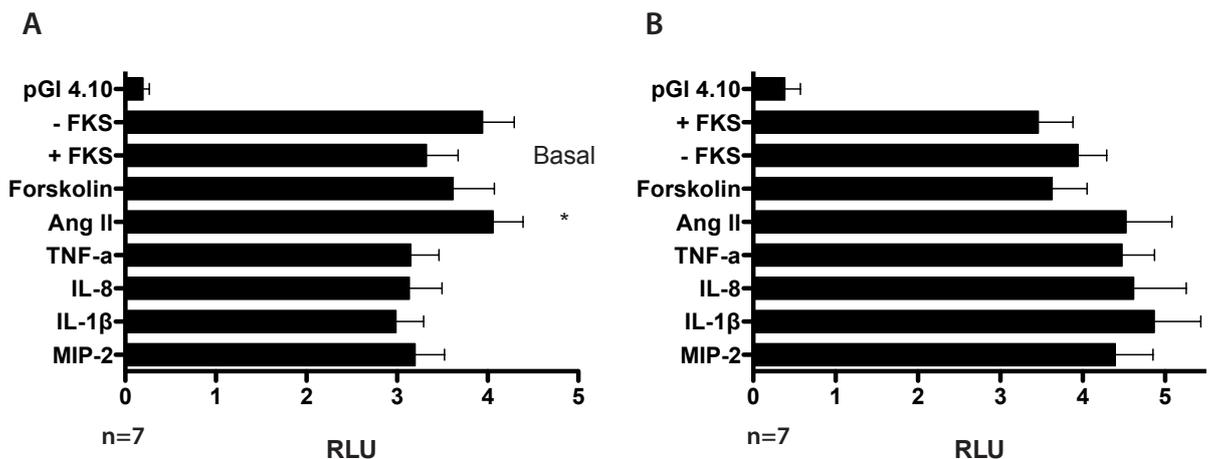
→ Abb. 30:

Funktionelle Untersuchung der Gesamt-Promotor-Aktivität des *GRK5*-Gens mit PMA-Stimulation unter Serumstimulation (A) und unter Serumentzug (B). Die Messung erfolgte im HEK293-Zellsystem 6 Stunden nach Stimulation.

Die Stimulation des GRK5-Promotors mit den oben genannten Substanzen wurde zudem im A 10-Zellsystem durchgeführt. Hier erfolgte die Messung 24 Stunden nach Stimulation. Die Aktivität des Konstrukts unter Serumstimulation ist der im HEK293-Zellsystem sehr ähnlich (→ vgl. Abb. 29, A). Jedoch ist die Gesamtaktivität im A 10-Zellsystem höher. Wie auch im HEK293-Zellsystem beobachtet, hat die Stimulation mit Forskolin (n.s.) und Angiotensin II ($p=0,0103$) eine Steigerung der Basal-Aktivität zur Folge (→ Abb. 31, A). Die Stimulation mit anderen Substanzen zeigen keine signifikanten Aktivitätsänderungen. Unter Serum-freien Bedingungen zeigen sich, wie auch im HEK293-Zellsystem beobachtet, ebenfalls keine stimulierenden Effekte auf die Aktivität des *GRK5*-Promotors (→ Abb. 31, B).

→ Abb. 31:

Luciferase-Assay des *GRK5*-Promotors unter Substanzstimulation im A 10-Zellsystem



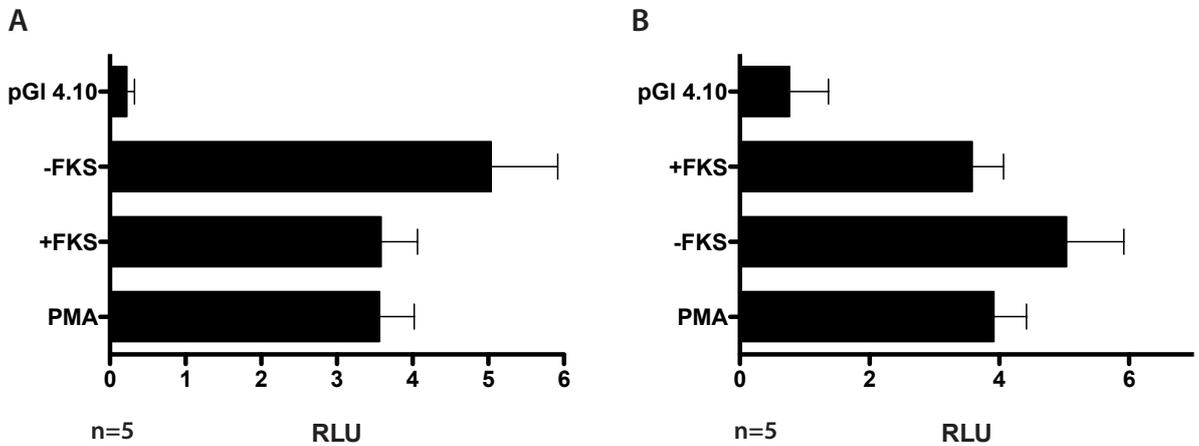
→ Abb. 31:

Funktionelle Untersuchung der Gesamt-Promotor-Aktivität des *GRK5*-Gens mit Substanzstimulation unter Serumstimulation (A) und unter Serumentzug (B). Die Messung erfolgte im A 10-Zellsystem 24 Stunden nach Stimulation.

Die Konstrukt-Aktivität unter PMA-Stimulation weist im Vergleich der Serumstimulation zu Serum-freien Bedingungen zunächst eine etwa gleiche Aktivität des Promotors auf (→ vgl. Abb. 32, A und B). Wie auch im HEK293-Zellsystem zeigt sich auch hier eher eine Hemmung der Aktivität unter PMA-Einfluss und Serumentzug (→ Abb. 32, B). Diese ist jedoch nicht signifikant. Unter Serumstimulation erzeugt die zusätzliche Behandlung der Konstrukte mit PMA keinerlei Aktivitätsänderung.

→ Abb. 32:

Luciferase-Assay des GRK5-Promotors unter PMA-Stimulation im A 10-Zellsystem



→ Abb. 32:

Funktionelle Untersuchung der Gesamt-Promotor-Aktivität des *GRK5*-Gens mit PMA Stimulation unter Serumstimulation (A) und unter Serumentzug (B). Die Messung erfolgte im A 10-Zellsystem 24 Stunden nach Stimulation.

4.6.

Untersuchungen zu *GRK5*-Promotor-SNPs – Genotyp-abhängige Promotorcharakterisierung

Ziel dieser Untersuchungen war zunächst die Identifizierung von SNPs, um Aussagen über deren Häufigkeit und deren Bedeutung für die Aktivität des Promotors treffen zu können. Dazu wurde der *GRK5*-Promotor vorab sequenziert und auf SNPs untersucht.

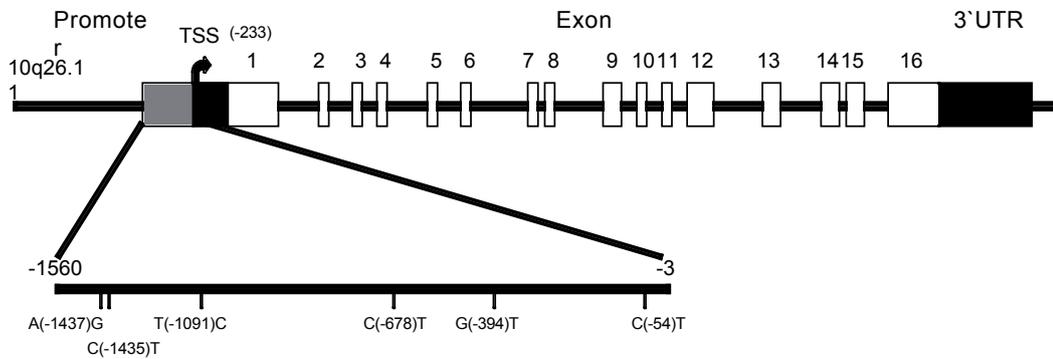
4.6.1.

Identifizierung und Lokalisation von *GRK5*-Promotor-SNPs

Bei der Sequenzierung des *GRK5*-Promotors wurden die SNPs A(-1437)G, C(-1435)T, T(-1091)C, C(-678)T, G(-394)T und C(-54)T entdeckt (→ Abb. 33). Der SNP C(-678)T wurde bisher nicht in Datenbanken beschrieben. Die 3' UTR des *GRK5*-Gens wies in den von uns untersuchten Proben keine SNPs auf (→ Abb. 33).

→ Abb. 33:

Lokalisation der untersuchten SNPs im GRK5-Gen



Zur Häufigkeitsuntersuchung der SNPs wurden die Allelfrequenzen in verschiedenen Ethnien bestimmt. Ferner wurde der Exon-2-Polymorphismus A(Leu41)T auf seine Häufigkeit untersucht, um Aussagen über eine eventuelle Kopplung zu Promotor-SNPs treffen zu können.

→ Tab. 8:

Genotypen und Allelfrequenzen der GRK5-Promotor SNPs sowie des Exon-2-Polymorphismus A(Leu41)T

A(-1437)G rs10787929	C(-1435)T rs7923896	T(-1091)C rs1397615	C(-678)T Neu	G(-394)T rs10886423	C(-54)T rs2230347	A(Leu41)T rs17098707	Allelfrequenz
0,40	0,59	1,00	0,59	0,98	0,11	0,02	Kaukasier n = 615
0,75	0,07	0,98	0,07	0,77	0,11	0,53	Afrikaner n = 355
0,61	0,31	1,00	0,31	0,91	0,13	0,01	Chinesen n = 305

Die Allelfrequenz bezieht sich hier auf die bei der Sequenzierung als SNP identifizierte Base (Bsp. A(-1437)G). Die Häufigkeiten der einzelnen Allele sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Hier fällt auf, dass die Allelfrequenzen des C(-1435)T und C(-678)T SNPs in den drei untersuchten Ethnien identisch sind. Diese Beobachtung ließ auf eine Kopplung der SNPs schließen, woraufhin die identifizierten SNPs auf Kopplung der Allele untersucht wurden. Alle untersuchten Genotypen liegen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

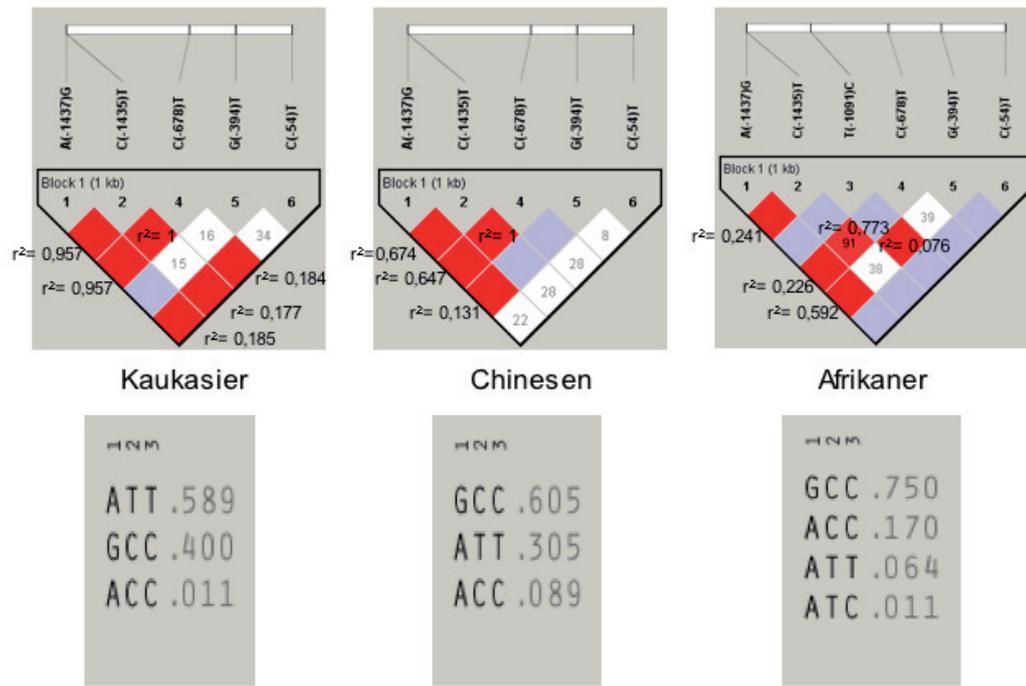
4.6.2.

Kopplungsanalyse der GRK5-SNPs

Die Kopplungsanalyse erfolgte durch das Programm *Haploview 4.1*. Es wurden jeweils Kopplungsanalysen zu den untersuchten Ethnien durchgeführt (→ Abb. 34). Dabei stehen rote Felder für einen Kopplungskoeffizienten $D' = 1$, das heißt also für eine starke Kopplung der Allele. Ist zusätzlich der Korrelationskoeffizienten $r^2 = 1$ kann man von einer 100%igen Kopplung ausgehen. Dies ist hier in Bezug auf den Promotor-SNP C(-1435)T und C(-678)T bei Kaukasiern und Afrikanern der Fall. Somit kann im Falle des einen Genotyps auf den anderen geschlossen werden. Beim SNP A(-1437)G kann bei einem r^2 knapp unter 1 zu 95% auf den Genotyp des SNP C(-1435)T und C(-678)T geschlossen werden. Es bilden sich somit Haplotypen, deren Allele aneinander koppeln. Im untersuchten Kollektiv der Chinesen kann man zu 67% von einer Kopplung des A(-1437)G SNPs und des C(-1435)T ausgehen. Der SNP A(-1437)G koppelt zu einer 64%igen Wahrscheinlichkeit an den C(-678)T-SNP. In Bezug auf diese drei SNPs zeigt sich bei der Analyse im Afrikaner Kollektiv zwar eine Kopplung ($D' = 1$, bzw. $=0,91$), jedoch stellt sich der Korrelationskoeffizient als niedrig dar. Blaue Felder zeigen zwar einen Kopplungskoeffizienten von 1, jedoch ist dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant. Weiße Felder sind weder statistisch signifikant, noch besteht eine Kopplung. D' ist in diesem Fall < 1 . Es kann also von keiner Kopplung der Allele ausgegangen werden. Da der SNP T(-1091)C bei Kaukasiern und Chinesen nicht aufgetreten ist, wurde er bei der Kopplungsanalyse nicht beachtet. Die so identifizierten Haplotypen beziehen sich auf eine Kopplung der SNPs A(-1437)G, C(-1435)T und C(-678)T. Dabei weist der Haplotyp ATT (A(-1437)G, C(-1435)T, C(-678)T) bei Kaukasiern eine Häufigkeit von 59% auf, wohingegen der GCC-Haplotyp (A(-1437)G, C(-1435)T, C(-678)T) mit über 60% bei dem untersuchten Chinesen-Kollektiv und mit 75% beim Afrikaner-Kollektiv überwiegt (→ Abb. 34).

→ Abb. 34:

Kopplungsanalyse der GRK5-SNPs und Häufigkeiten der Haplotypen



→ Abb. 34:

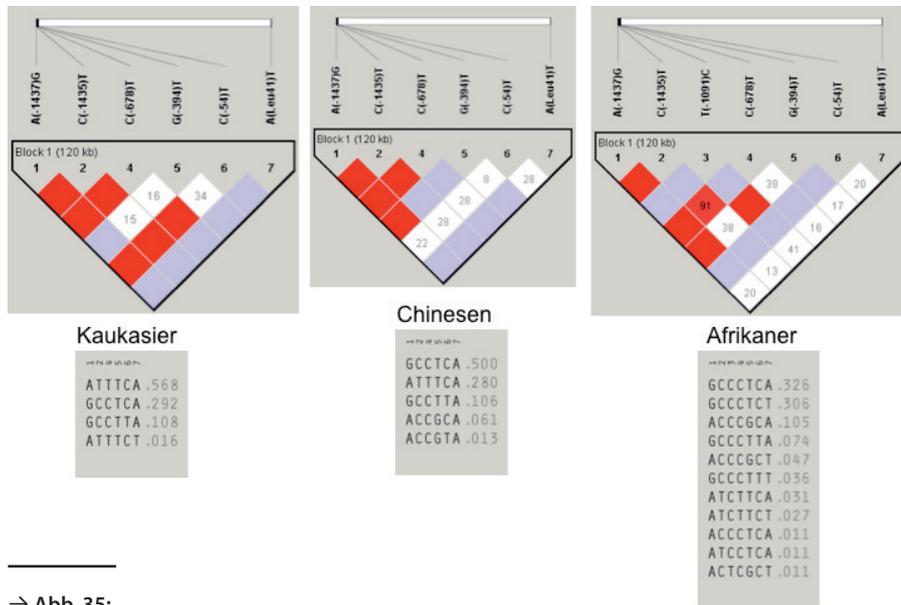
Schematische Darstellung der Kopplungsanalyse der GRK5-SNPs (oben) sowie der berechneten Häufigkeiten der Haplotypen. Bei den Haplotypen ATT, GCC, ACC und ATC handelt es sich um eine Kopplung der SNPs A(-1437)G, C(-1435)T und C(-678)T.

Kopplungsanalyse unter Einbeziehung des A(Leu41)T-SNP:

Der Exon-2-Polymorphismus zeigt sich mit der Ausprägung des T-Allels bei Kaukasiern und Chinesen in der Kopplung zu Promotor-SNPs zunächst als sehr selten. Lediglich 1,6% des untersuchten Kaukasier-Kollektivs weisen Allelkombinationen mit dem T-Allel des Exon-2-Polymorphismus auf. Bei Afrikanern ist das T-Allel wesentlich häufiger ausgeprägt, wobei 30,6% der untersuchten Proben eine Allelkombination mit genanntem T-Allel erkennen lassen. Jedoch lässt sich auch hier keine signifikante Kopplung zu Promotor-SNPs darstellen (→ Abb. 35).

→ Abb. 35:

Kopplungsanalyse unter Einbeziehung des A(Leu41)T-Polymorphismus und Häufigkeiten der möglichen Haplotypen



→ Abb. 35:

Schematische Darstellung der Kopplungsanalyse der GRK5-SNPs incl. des A(Leu41)T-SNP (oben) und Häufigkeiten möglicher Haplotypen (unten).

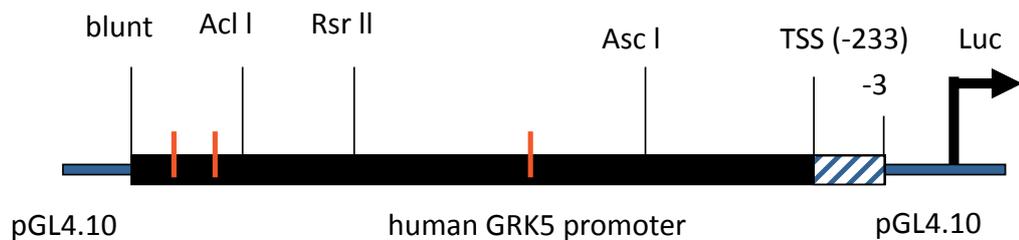
4.6.3.

Untersuchung SNP-abhängiger Aktivitätsunterschiede des GRK5-Promotors

Um mögliche SNP-abhängige Aktivitätsunterschiede in der Promotor-Aktivität zu messen, wurden Deletionskonstrukte, die den jeweiligen Genotyp identifizierter SNPs enthalten, in einem *Luciferase-Assay* getestet. Dazu wurden Konstrukte, die die Haplotypen ATT, GCC und ACC (→ vgl. Abb. 34) enthalten, generiert und gegeneinander gemessen.

→ Abb. 36:

GRK5-Promotor im pGL 4.10-Vektor mit Haplotyp-Lokalisation

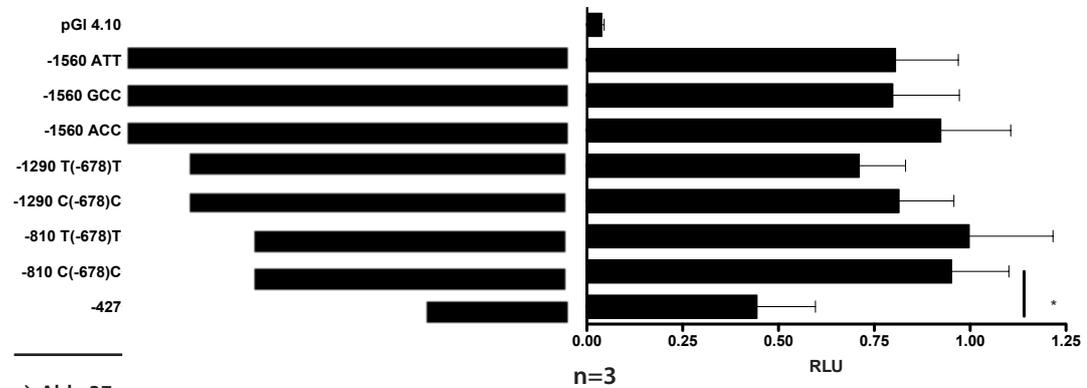


→ Abb. 36:

Darstellung des GRK5-Promotors im pGL 4.10-Vektor mit Lokalisation der Schnittstellen zur Deletionskonstrukt-Generierung. Die Lokalisation der Haplotyp-Allele ist rot markiert.

→ Abb. 37:

Luciferase-Assay zur Genotyp-abhängigen Promotorcharakterisierung im HEK293-Zellsystem



→ Abb. 37:

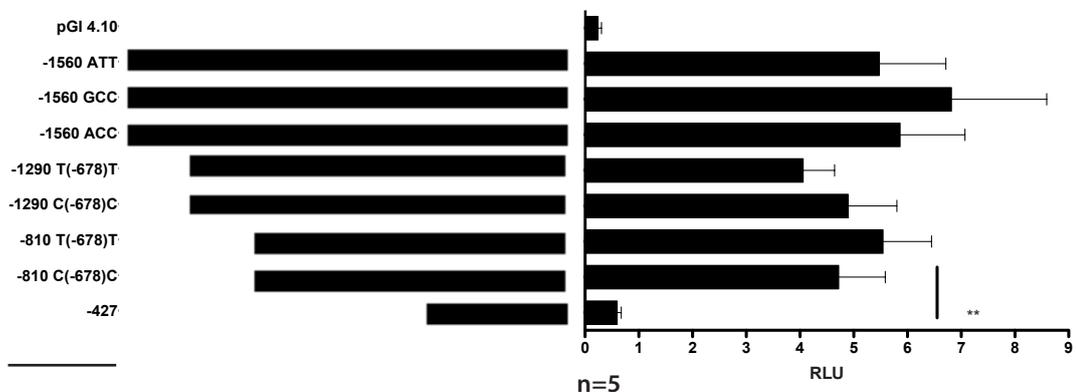
Ergebnis des *Luciferase-Assays*

zur Untersuchung SNP-abhängiger Aktivitätsunterschiede im HEK293-Zellsystem 24 Stunden nach Transfektion.

Bei der Auswertung dieses Versuchs im HEK293-Zellsystem zeigt sich zunächst, dass das Konstrukt -1560 mit den Haplotypen ATT, GCC und ACC keine signifikanten, Genotyp-abhängige Aktivitätsunterschiede zeigt. Ebenso scheint der C(-678)T-SNP keine signifikanten Einflüsse auf die Aktivität des -1290- und -810-Konstrukts zu haben. Jedoch stellt sich, wie bereits in Abbildung 27 und 28 gezeigt, eine deutliche Aktivitätsabnahme des -427-Konstrukts dar ($p=0,0273$), bei welchem eine Deletion von knapp 400 bp im Vergleich zum -810-Konstrukt vorgenommen wurde. Die Aktivität dieses Konstrukts nimmt im Vergleich zur Gesamtaktivität der Konstrukte um 25 bis 50 % ab (→ Abb. 37).

→ Abb. 38:

Luciferase-Assay zur Genotyp-abhängigen Promotorcharakterisierung im A 10-Zellsystem



→ Abb. 38:

Ergebnis des *Luciferase-Assays*

zur Untersuchung SNP-abhängiger Aktivitätsunterschiede im A 10-Zellsystem 24 Stunden nach Transfektion.

Hier zeigt sich im Gegensatz zum HEK293-Zellsystem eine deutlich höhere Grundaktivität. Diese ist etwa 6fach höher. Weiterhin fällt ein sehr deutlicher Abfall der Aktivität des -427-Konstrukts auf, und zwar um den Faktor 5 ($p=0,0069$). Es lassen sich auch hier keine Genotyp-abhängigen Unterschiede feststellen (\rightarrow Abb. 38). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nach den Ergebnissen der durchgeführten *Luciferase-Assays* den etwa 400 bp zwischen Position -810 und -427 eine besondere Bedeutung für die Aktivität des Promotors zukommt, es sich jedoch keine Genotyp-abhängigen Unterschiede abzeichnen.

4.6.4

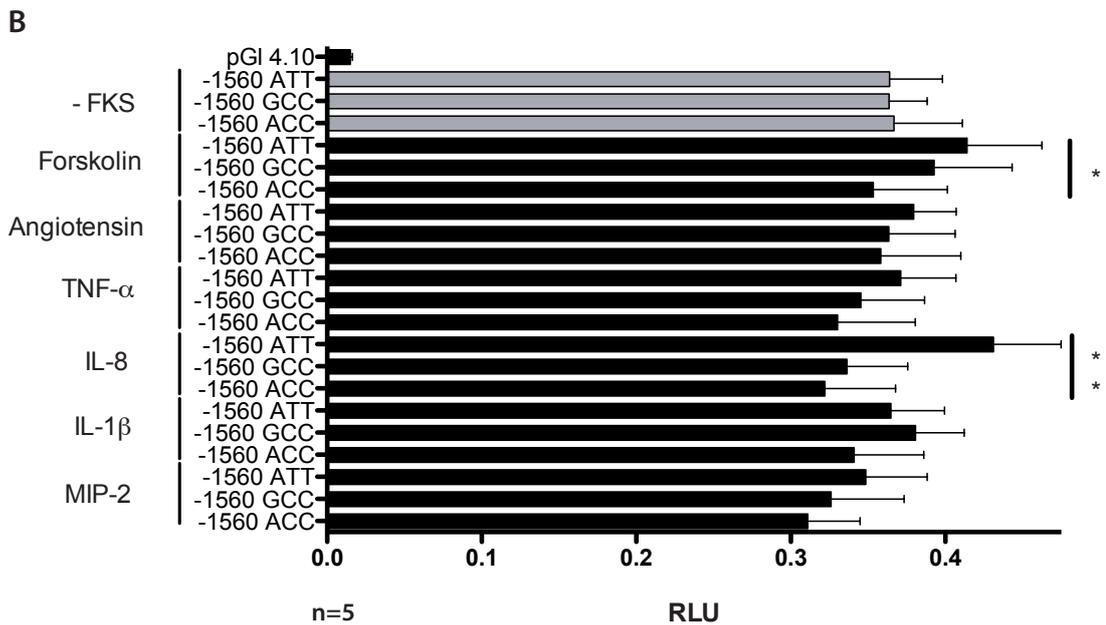
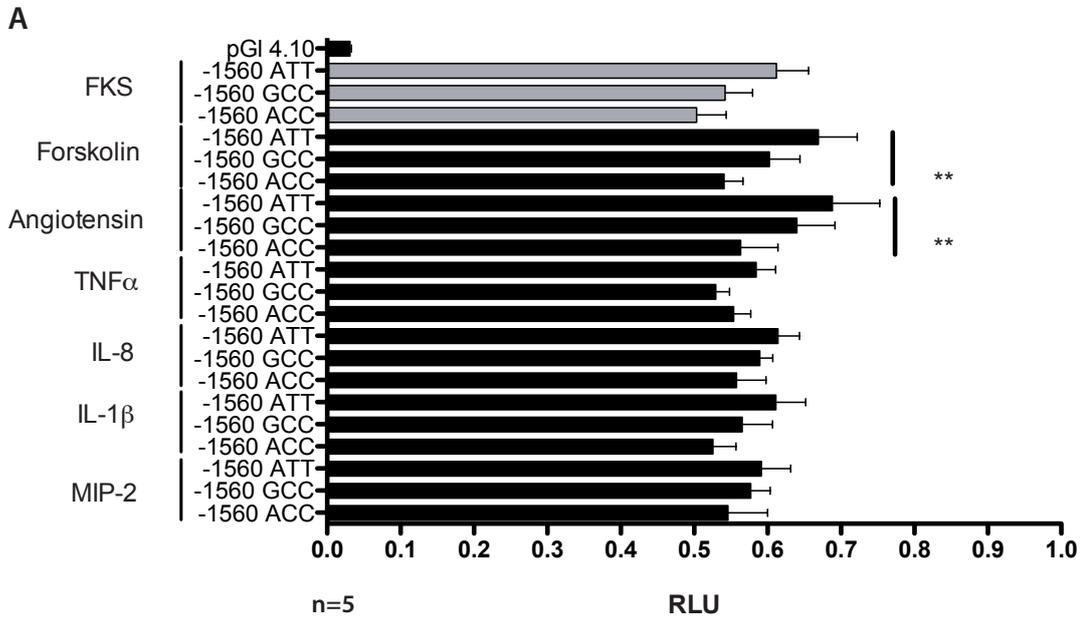
Haplotypabhängige *GRK5*-Promotor-Charakterisierung unter Substanzstimulation

Ein Vergleich der Ergebnisse im HEK293-Zellsystem unter Serumstimulation (\rightarrow Abb. 39, A) und unter Serumentzug (\rightarrow Abb. 39, B) ergibt zunächst eine etwa 40 % niedrigere Aktivität der Promotorkonstrukte unter Serumentzug. Die Vergleichswerte des ATT-, GCC- und ACC-Konstrukts zur Stimulation ergeben sich aus der Zugabe von FKS (\rightarrow Abb. 39, A) bzw. dem Entzug von FKS (\rightarrow Abb. 39, B) und sind hier grau unterlegt. Diese Werte stellen die Grundaktivität der Konstrukte dar. Hier fällt auf, dass die Haplotypen signifikant unterschiedliche Aktivitäten aufweisen ($p=0,0083$) und zwar in absteigender Reihenfolge ATT, GCC und ACC (\rightarrow Abb. 39, A). Nach Bonferroni-Korrektur für multiples Testen zeigt sich für den Haplotyp ATT vs. ACC ein Aktivitätsunterschied $P<0,01$. Ein ähnliches Bild ergibt sich nach der Zugabe von Forskolin. Es wird auch hier die Abnahme der Aktivität in Abhängigkeit des Haplotyps deutlich. Die Aktivität des ATT-, GCC- und ACC-Haplotyps ist signifikant unterschiedlich ($p=0,0055$). Der Aktivitätsunterschied zwischen ATT und ACC liegt auch hier nach Bonferroni-Korrektur im signifikanten Bereich $P<0,01$. Die Stimulation mit Angiotensin II ergibt gleichfalls einen Haplotyp abhängigen Aktivitätsunterschied ($p=0,004$). Die Bonferroni-Korrektur für die ATT gegen ACC-Variante ergibt einen P-Wert von $<0,01$. Die Haplotypen ATT, GCC und ACC des *GRK5*-Promotors erweisen sich also in ihrer Grundaktivität, bei der Stimulation mit Forskolin und bei der Stimulation mit Angiotensin als signifikant unterschiedlich in ihrer Aktivität. Dabei entspricht die ATT-Variante der höchsten

Aktivität, die ACC-Variante der niedrigsten. Die Stimulation mit Interferonen wie TNF- α , IL-8 und IL-1 β oder dem Hormon MIP-2 ergibt keine signifikanten Aktivitätsunterschiede innerhalb der Genotyp-Varianten (\rightarrow Abb. 39, A). Die Ergebnisse unter Serumentzug zeigen in der Grundaktivität keine Genotyp-abhängigen Unterschiede (\rightarrow Abb. 39, B). Die Stimulation mit Forskolin dagegen zeigt analog zur Serumstimulation eine signifikant abnehmende Aktivität der Promotor-Konstrukte in der Reihenfolge ATT, GCC und ACC ($p=0,0054$). Auch hier besitzt die ATT-Variante die höchste Aktivität, die ACC-Variante die niedrigste. Die Stimulation mit IL-8 ergab eine deutliche Aktivitätssteigerung der ATT-Genotyps ($p=0,0058$), wobei der GCC- und ACC-Genotyp sich annähernd gleichen. Nach Bonferroni Korrektur stellt sich sowohl für die Stimulation mit Forskolin, als auch mit IL-8 ein signifikanter Unterschied zwischen der ATT- und ACC-Variante dar ($p<0,01$). Die Stimulation mit Angiotensin II ergab unter Serumentzug keine signifikanten Unterschiede. Ebenso konnten für die Stimulation mit anderen aufgeführten Stimulantien keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

→ Abb. 39:

Luciferase-Assay der *GRK5*-Promotor Konstrukte unter Substanzstimulation im HEK293-Zellsystem



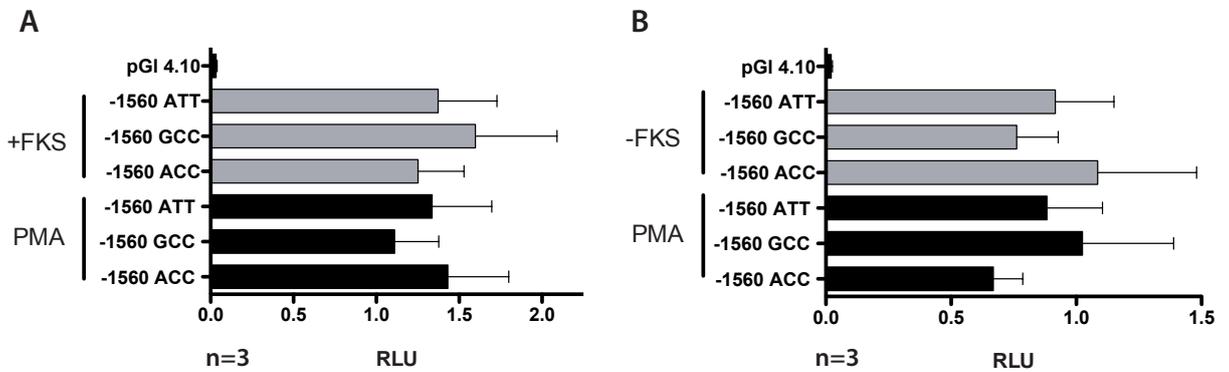
→ Abb. 39:

Haplotyp-abhängige *GRK5*-Promotor-Charakterisierung mit Substanzstimulation unter Serumstimulation (A) und Serumentzug (B) im HEK293-Zellsystem, 6 Stunden nach Stimulation. (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$)

Die Stimulation mit PMA im HEK293-Zellsystem zeigt weder unter Serumstimulation (→ Abb. 40, A), noch unter Serumentzug (→ Abb. 40, B) signifikante Unterschiede in der Promotor-Aktivität.

→ Abb. 40:

Luciferase-Assay der *GRK5*-Promotor-Konstrukte unter PMA-Stimulation im HEK293-Zellsystem



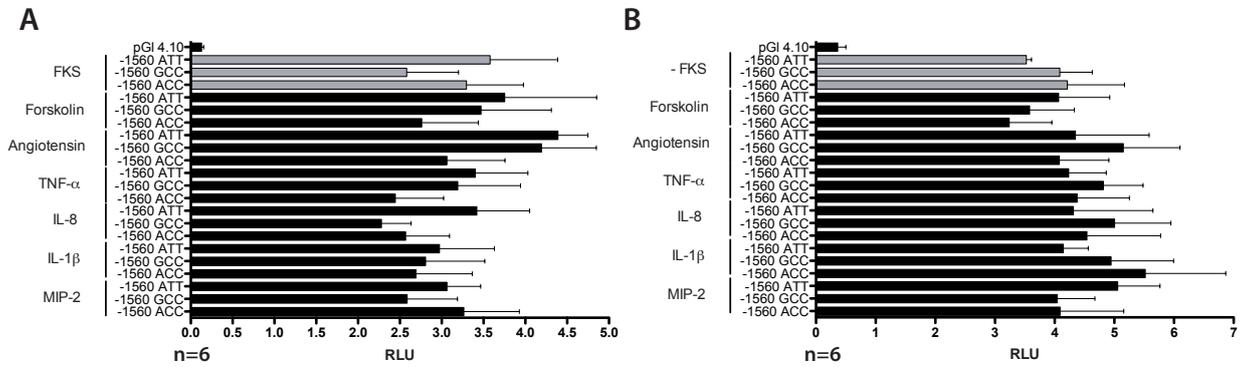
→ Abb. 40:

Haplotyp-abhängige *GRK5*-Promotor-Charakterisierung mit PMA-Stimulation unter Serumstimulation (A) und Serumentzug (B) im HEK293-Zellsystem, 6 Stunden nach Stimulation.

Die Substanzstimulation der *GRK5*-Promotor-Haplotypen zeigt im A10-Zellsystem deutliche Unterschiede im Vergleich zum HEK293-Zellsystem. Zunächst ist die Grundaktivität in A10-Zellen deutlich höher (→ vgl. Abb. 39, A und B mit Abb. 41, A und B). Des Weiteren fällt auf, dass ungleich zur Untersuchung in HEK293-Zellen, die Aktivität der Konstrukte unter Serumentzug höher ist. Sowohl unter Serumentzug, als auch unter Serum-Einfluss lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Haplotypen erkennen. Jedoch zeichnet sich eine Tendenz der niedrigeren Aktivität des GCC-Haplotyps ab. Unter Serumstimulation wird bei der Testung mit Angiotensin II eine Stimulation des Haplotyps GCC zum Vergleichswert deutlich ($p=0,0011$). Die Haplotypen ATT und ACC werden dagegen durch Angiotensin II in ihrer Grundaktivität nicht beeinflusst. Die Behandlung mit TNF- α führt hier zu einer Hemmung der Aktivität des ACC-Haplotyps ($p=0,0079$). Die ATT- und GCC-Variante werden nicht beeinflusst. Die Testung der weiteren aufgeführten Substanzen ergab keine signifikante Beeinflussung der Haplotypen auf deren Basalaktivität (→ Abb. 41, A). Die Substanzstimulation unter Serumentzug ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in zwischen Haplotypen und der Basalaktivität (grau markiert) (→ Abb. 41, B).

→ Abb. 41:

Luciferase-Assay der GRK5-Promotor-Konstrukte unter Substanzstimulation im A 10-Zellsystem



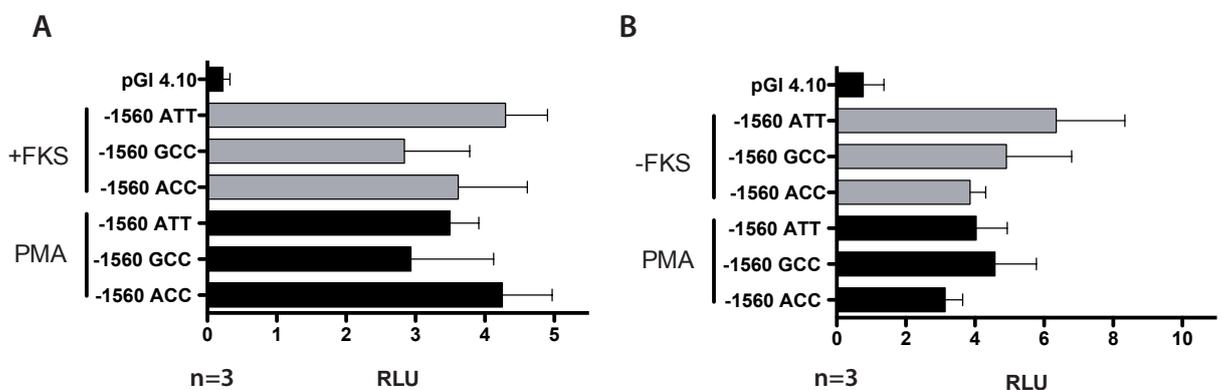
→ Abb. 41:

Haplotyp-abhängige GRK5-Promotor-Charakterisierung mit Substanzstimulation unter Serumstimulation (A) und Serumentzug (B) im A 10-Zellsystem, 24 Stunden nach Stimulation.

Die Testung des Einflusses von PMA auf die GRK5-Konstrukte erfolgte ebenfalls zusätzlich im A 10-Zellsystem. Unter Serumstimulation (→ Abb. 42, A) zeigt sich die Basalaktivität (grau unterlegt) ähnlich der in Abbildung 41. Die Aktivität des GCC-Haplotyp ist hier jedoch nicht signifikant. Die Zugabe von PMA erzeugt dabei keine Änderungen in der Konstrukt-Aktivität. Unter Serum-freien Bedingungen (→ Abb. 42, B) ist ebenfalls keine Beeinflussung der Aktivität durch PMA zu erkennen. Die Basal-Aktivität liegt auch hier, wie im Stimulationsversuch (→ Abb. 41, B) bei etwa 4 RLU.

→ Abb. 42:

Luciferase-Assay der GRK5-Promotor Konstrukte unter PMA Stimulation im A 10-Zellsystem



→ Abb. 42:

Haplotyp-abhängige GRK5-Promotor-Charakterisierung mit PMA-Stimulation unter Serumstimulation (A) und Serumentzug (B) im A 10-Zellsystem, 24 Stunden nach Stimulation.

4.7.

Untersuchungen zum Proteinbindungsverhalten des GRK5-Promotors

In Hinblick auf die Untersuchung potentieller Proteinbindungsstellen wurden mehrere Fragestellungen bearbeitet. Es wurde zum einen die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Abschnitte des Promotors getestet und zum anderen wurde beurteilt, wie stark sich diese Bindung darstellt. Des Weiteren wurde durch spezifisch generierte Sonden eine Beeinflussung der Bindung durch Genotyp-Varianten untersucht. Zusätzlich konnten durch *In-silico*-Analysen potentielle Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die Rückschlüsse auf endogene Proteinbindungen zulassen.

4.7.1.

Testung des Proteinbindungsverhaltens mittels EMSA

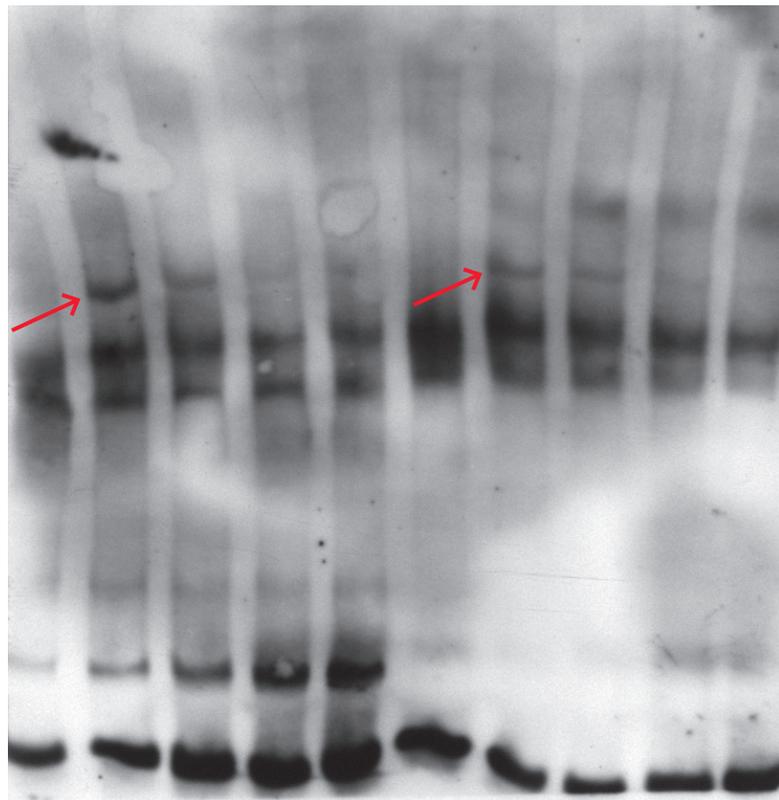
Um einen Überblick verschiedener endogener Systeme zu erlangen, wurden für die Testung der Proteinbindung Zellkernextrakte unterschiedlicher Zelllinien gewonnen. Die verwendeten Sonden sind im Anhang unter "Primer zur Untersuchung von Transkriptionsfaktoren an GRK5" aufgeführt. Bei diesem EMSA wurden 10-Zellkernextrakte in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um bei einer Proteinbindung Unterschiede in der Bandenstärke zu detektieren. Auf diese Weise kann eine spezifische Bindung konzentrations-abhängig verifiziert werden. Bei einer spezifischen Bindung an die allelspezifische Sonde sollte in diesem Fall die Bandenstärke mit Zunahme des ungelabelten Oligonukleotid-Überschusses (12,5 bis 124fach) abnehmen. Dies ist hier bei beiden Genotyp-Varianten der Fall, was für eine spezifische Bindung von Protein an die Sonde spricht (→ Abb. 43).

→ Abb. 43:

EMSA des A(-1437)G- und C(-1435)T-SNP mit der Genotypvariante AA/CC und AA/TT

```

-1,583 tcctcctct ggacagagaa ggcccagagt cggcttctga acggatatcc
-1,533 ggcccgagg atgcagagga ggcaaaggcc tcattgttct ttggggcctg
-1,483 cctgccccgc cccagctgt aggacactcg tggcagatcc cgggtgacg rs10787929 rs7923896
-1,433 aagacagccc atttcagga gtggggcctt cggagcggag ggagcaagga
-1,383 aacggggctg agcacagacc tggagtctga tgttctgagc ataactg
-1,333 aaggagctaa gagcccaaa ataaataaga ccggaattta aaaacgttaa
-1,283 tcccacgccg gcttggcgct ggctggctg ttactcata acgctccca
    
```



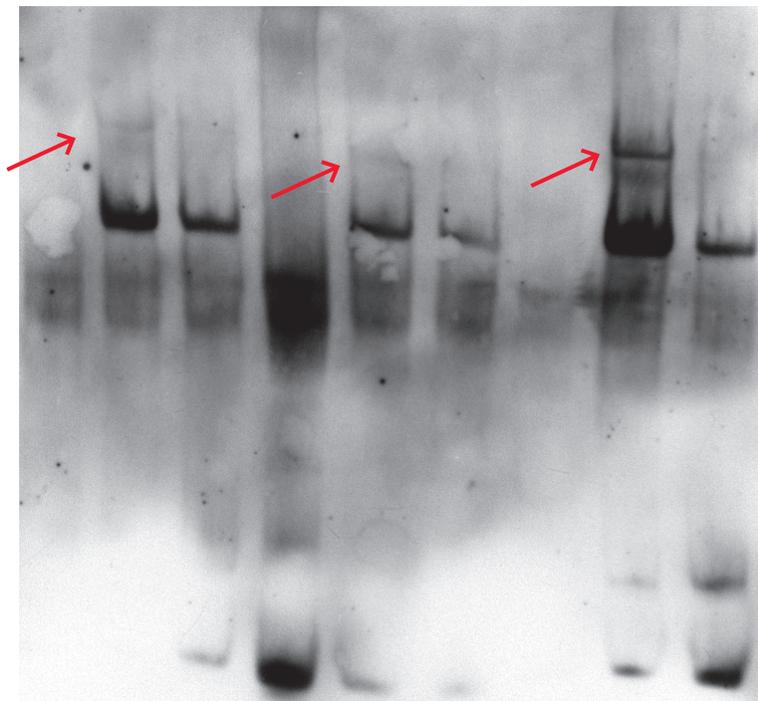
Labeled Oligonukleotid (1:10)	AA/CC	AA/CC	AA/CC	AA/CC	AA/CC	AA/TT	AA/TT	AA/TT	AA/TT	AA/TT
Unlabeled Oligonukleotid			124 fach	62 fach	124 fach			124 fach	62 fach	124 fach
A10 ZKE		+	+	+	+		+	+	+	

Des Weiteren wurde zusätzlich der Genotyp GG/CC untersucht (→Abb. 44), so dass die bei der Kopplungsanalyse identifizierten Haplotypen in einem EMSA erfasst wurden. Der Überschuss an ungelabeltem Oligonukleotid betrug das 124fache. Die allelspezifischen Sonden wurden mit HEK293-Zellkernextrakten inkubiert. Spezifische Banden sind ebenfalls mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Es lässt sich bei allen Genotyp-Varianten eine Bindung von Protein bestätigen, da die Kompetition keine Bande mehr erkennen lässt.

→ Abb. 44:

EMSA des A(-1437)-G und C(-1435)T-SNP mit der Genotypvariante AA/TT, GG/CC und AA/CC

-1,583 tcctccttct ggacagagaa ggcccagagt cggcttctga acggatatcc
 -1,533 ggcccgcagg atgcagagga ggcaaaggcc tcattgttct ttgggcctg
 -1,483 cctgccccgc ccccagctgt aggacactcg tggcagatcc cgggtgacgc **rs10787929 rs7923896**
 -1,433 aagacagccc atttcagga gtggggcctt cggagcggag ggagcaagga
 -1,383 aacggggctg agcacagacc tggagtctga tgttctgagc ataactgga
 -1,333 aaggagctaa gagccccaaa ataataaga ccggaattta aaaacgttaa
 -1,283 tcccacgccg gcttggcgtc ggctggctg ttactcatta acgtcccca



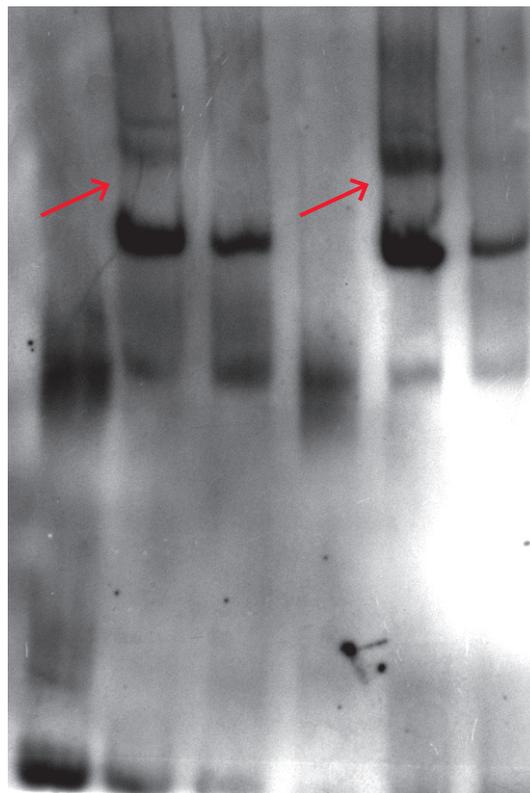
Labeled Oligonukleotid (1:10)	AT	AT	AT	GC	GC	GC	AC	AC	AC
Unlabeled Oligonukleotid			124 fach			124 fach			124 fach
HEK293 -ZKE		+	+		+	+		+	

Im folgenden EMSA wurde der SNP C(-678)T untersucht, der nach Kopplungsanalyse zu 100 % mit dem SNP C(-1435)T koppelt und ein Allel der identifizierten Haplotypen darstellt. Die verwendeten Sonden wurden zunächst mit HEK293-Zellkernextrakten inkubiert und zeigten im Falle des C-Allels eine Doppelbande, wobei die T-Allel-Sonde lediglich eine Bande erkennen lässt (→ Abb. 45). Dies deutet auf ein unterschiedliches Proteinbindungsverhalten der beiden Allele. Das es sich um spezifische Banden handelt, wird durch die Kompetition

mit ungelabeltem Oligonukleotid deutlich, da beide Banden in diesen Spuren verschwinden. Um das Bindungsverhalten in einem kardiovaskulären System zu testen, wurde in einem nächsten EMSA mit Zellkernextrakten vom rechten Vorhofgewebe des Herzens inkubiert (→ Abb. 46). Auch hier zeigt sich eine deutliche Proteinbindung an die Sonden. Jedoch sind keine Genotyp-abhängigen Unterschiede erkennbar.

→ Abb. 45:
EMSA des C(-678)T-SNP

-783 cgGCCGagct ggcagccctc ccactccgag cacggctcgg gacccgcact
 -733 ggctcctgcc gggccgcggc gcttcacgcg ccgtcaccgg ggcccgtgca
 -683 ctccgcttc cgggctggcg acggggcggg aagggggcaa gcgggagcct
 -633 gcgggggggt gctggggact tcggcttggc tgggccgcct ttgagtcgcc
 -583 tgctggccgg gcggtgccg ccttcgcttt cggtgccgc cggggcggg

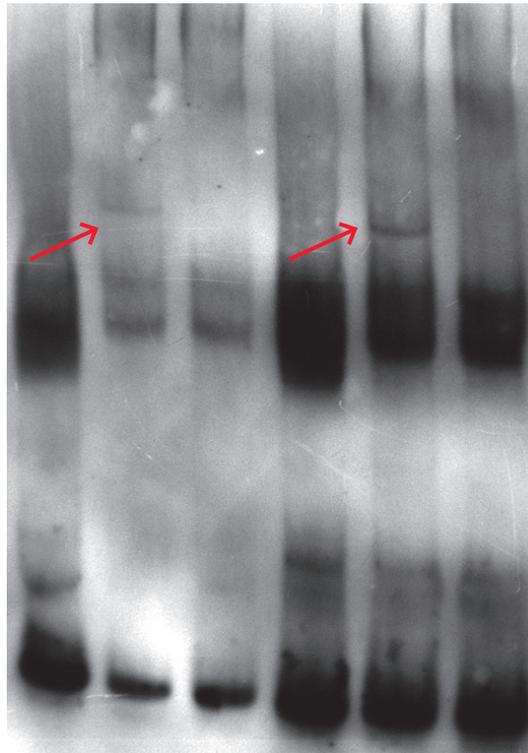


Labeled Oligonukleotid (1:10)	CC	CC	CC	TT	TT	TT
Unlabeled Oligonukleotid			124 fach			124 fach
HEK293-ZKE		+	+		+	+

→ Abb. 46:

EMSA des C(-678)T-SNP

-783 cggccgagct ggcagcctc ccactccgag cacggctcgg gacccgcact
 -733 ggctctgcc gggccgcggc gcttcacgcg ccgtcaccgg ggcccgtgca
 -683 ctccgcttc cgggctggcg acggggcggg aagggggcaa gcgggagcct
 -633 gcgggggggt gctggggact tcggcttggc tgggccgcct ttgagtcgcc
 -583 tgtcgccgg gcggtgccg ccttcgctt cggtgccgc cggggcggg



Labeled Oligonukleotid (1:10)	CC	CC	CC	TT	TT	TT
Unlabeled Oligonukleotid			124 fach			124 fach
HO-ZKE		+	+		+	+

4.7.2.

***In-silico*-Analyse potentieller Proteinbindungen an GRK5-Promotorsequenzen**

Um einen Überblick der Proteine, die an die spezifische Sequenz binden können, zu erlangen, wurde eine *In-silico*-Analyse für Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Die Sequenz des AA/TT-Genotyps weist hier eine Transkriptionsfaktoren-Bindungsstelle mehr auf, als der GG/CC- oder AA/CC-Genotyp. Zudem besteht für den Genotyp GG/CC keine Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren MIF1 und RXR, die jedoch am den AA/TT- und AA/CC-Genotyp binden können. Der Transkriptionsfaktor NRSE zeigt dagegen keine Bindung an die AA/CC-Variante.

Die *In-silico*-Analyse der spezifischen Sequenz des C(-678)T-SNP wurde ebenfalls mittels *MAT-inspector* durchgeführt. Bei der Auswertung möglicher Transkriptionsfaktor-Bindungen fällt auf, dass bei beiden Varianten CC und TT eine Bindung von ETS1 postuliert wird. Im Falle des AA-Genotyps ist eine weitere Bindung des MTF-1 möglich, wohingegen der TT-Genotyp eine Bindung von Myb und E2F zulässt. Die TT-Variante lässt dagegen die Bindung des Myb und E2F zu.

4.8.

Untersuchungen zur miR-1-, miR-133- und miR-208-Expression in Herzgewebe

Ziel der Untersuchungen war es zunächst einen Überblick über die Expression der miRNA von Interesse zu erhalten, in verschiedenen Geweben zu testen, und diese in einem weiteren Schritt quantitativ zu erfassen. Die daraus hervorgehenden Ergebnisse sollten anschließend in Korrelation zu klinischen Parametern der Herzinsuffizienz gesetzt werden. Ferner sollte untersucht werden, ob eine Assoziation zur Expression kardial-relevanter Gene besteht. Diese Analyse hatte das Ziel, Aussagen über die Bedeutung der getesteten miRNAs in Korrelation zu klinischen Parametern der Herzinsuffizienz treffen zu können und zusätzlich Hinweise auf mögliche Zielgene von miRNAs zu erhalten.

4.8.1.

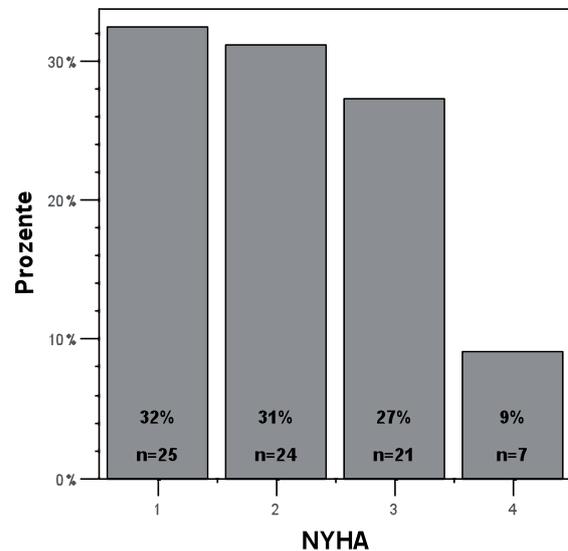
Charakterisierung des untersuchten Patientenkollektivs

Die Daten zur Patienten-Charakterisierung sind in Abbildung 47 dargestellt. Abbildung 47 gibt einen Überblick zur Anzahl der Patienten des Kollektivs und einigen Parametern allgemeiner und klinischer Befunde. Dabei fällt auf, dass sich die Patienten durchschnittlich in NYHA-Stadium II befinden. 63 % zeigen dabei Symptome einer Herzinsuffizienz, die NYHA-Stadium I und II entsprechen, 36 % beschreiben Symptome der NYHA-Klassifizierung nach Stadium III und IV (→ Abb. 47, B).

→ Abb. 47:
Charakterisierung des KHK-Patienten-Kollektivs

A

KHK	ges.
Patienten, n	83
Alter	66±10
Geschlecht, m/w	68/15
BMI, kg/m ²	28.1±3,4
Raucher, %	13,8
NYHA Klassifizierung	2.13±0.97
NT-proBNP [pg/ml]	1041±2951



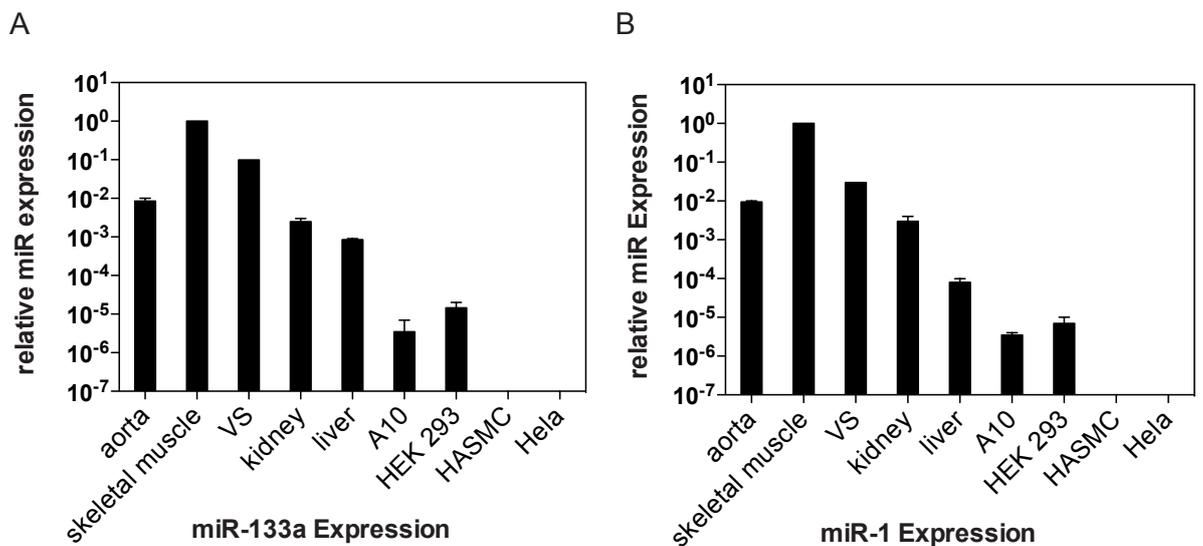
Des Weiteren fällt auf, dass die Patienten durchschnittlich mittelgradig erhöhte NT-proBNP-Spiegel von etwa 1000 pg/ml haben.

4.8.2.

Expression der mikroRNA von Interesse in verschiedenen Geweben und Zelllinien

→ Abb. 48:

miR-133- und miR-1-Expression in Geweben und Zelllinien



Die Quantifizierung der miRNA-Expression erfolgte in verschiedenen Geweben der Ratte sowie in Zellsystemen mittels *TaqMan-miRNA-Assay*. Dabei wurde die Expression im Skelettmuskel als Referenz 1 gesetzt, da es sich um muskelspezifische miRNAs handelt. Diese Muskelspezifität spiegelt sich auch in diesen Ergebnissen wieder, da auch hier die höchste Expression im Skelettmuskel zu detektieren war. Die Expression wurde logarithmisch aufgetragen und mit der Formel $2^{-\Delta Ct}$ berechnet, wie in den Methoden zur Statistik erläutert. Im Vergleich der Abbildungen 48 A und B fällt auf, dass die Expression der miR-133 und miR-1 nahezu identisch sind. In HASM- und Hela-Zellen waren diese miRNAs nicht zu detektieren. Die Expression in Aorta und Vena saphena (VS) ist um das hundert- bzw. tausendfache niedriger als im Skelettmuskel. Die Expression in Leber und Niere sind etwa um das tausend- bzw. zehntausendfache niedriger. In keinem der untersuchten Gewebe konnte die miR-208 quantifiziert werden.

4.8.3.

Expression der mikroRNA von Interesse in Herzgewebe

Diese Ergebnisse zeigen eine ähnliche miRNA-Expression der miR-1, mir-133a und miR-133b. Sie sind in Herzgewebe mit Ct-Werten zwischen 18 und 26 stärker exprimiert als die miR-208 mit Ct-Werten von 28 bis 34 (→ Abb. 49).

→ Abb. 49:

TaqMan-Ergebnisse der miRNA-Expression in Herzgewebe



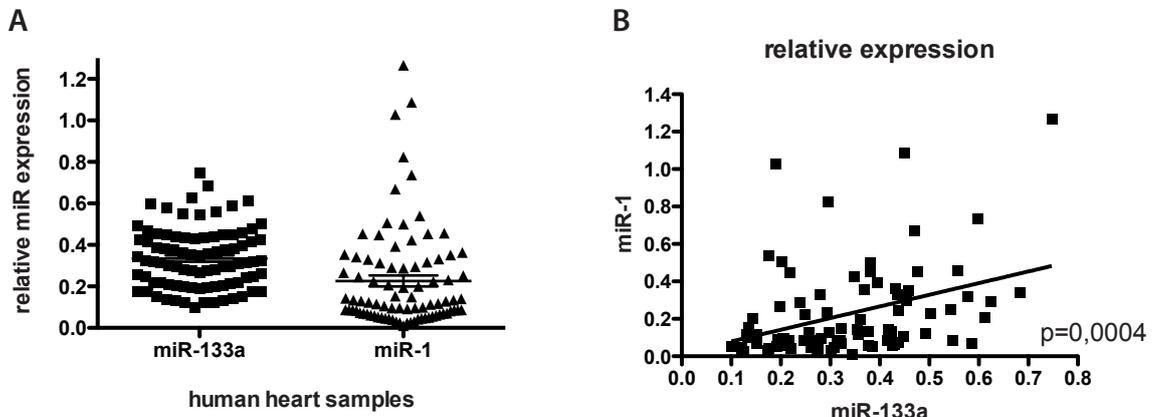
→ Abb. 49:

miRNA-Expression in Herzgewebe.

Bei der Betrachtung der relativen miRNA-Expression ist ein ähnliches Expressionsprofil der miR-1 und miR-133a zu erkennen, jedoch kein identisches. Während die Expression der miR-133a kaum Streuung zeigt, ist die der miR-1 deutlichere Streuung unterworfen (→ Abb. 50, A). Im Vergleich der miR-1- mit der miR-133a-Expression zeigt sich eine signifikante Korrelation mit $p=0,0004$ (→ Abb. 50, B). Eine Korrelation dieser beiden miRNAs ist besonders interessant, weil die miR-1 und miR-133 gemeinsam transkribiert werden.

→ Abb. 50:

Relative Expression der miR-133a und miR-1 in Herzgewebe und deren Korrelation



→ Abb. 50:

Relative Expression der miR-133a- und miR-1-Expression in Herzgewebe (A) und deren Korrelation zueinander (B).

4.8.4.

Assoziation von klinischen Parametern zur mikroRNA Expression

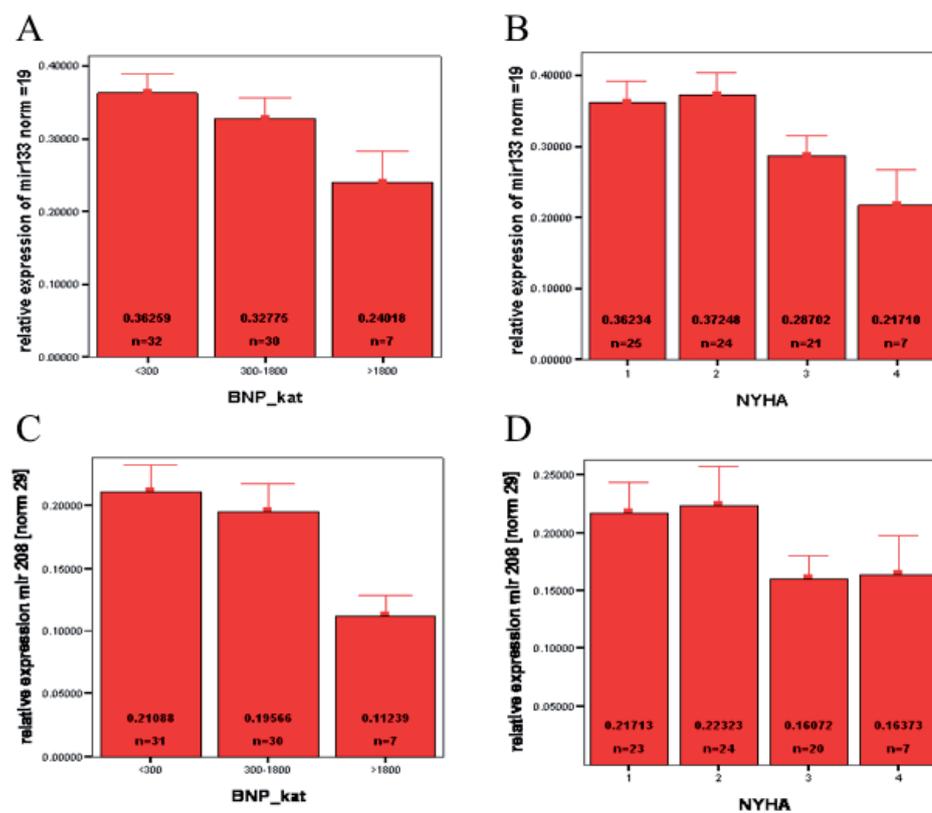
Im Folgenden wurde die Korrelation der miR-1, miR-133 und miR-208 zu klinischen Parametern erfasst. Der BNP-Wert im Blut wurde präoperativ gemessen und in drei Kategorien eingeteilt. Bei BNP-Werten unter 300 pg/ml ist die Ausbildung einer Herzinsuffizienz als eher unwahrscheinlich anzusehen, bei Werten zwischen 300 bis 1800 pg/ml ist sie als intermediär einzustufen und im Falle von Werten über 1800 pg/ml sehr wahrscheinlich⁹¹⁻⁹³. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine signifikante Korrelation ($p=0.0131$) zwischen intermediären und hohen BNP-Spiegeln und miR-133-Expression. Patienten mit hohen BNP-Spiegeln im Blut zeigen niedrigere miR-133-Expression als Patienten mit niedrigen BNP-Konzentrationen. Hohe miR-133-Expression geht also mit niedrigen BNP-Konzentrationen einher (→ Abb. 51 A). Ebenso korreliert der anamnestisch erfasste NYHA-Wert mit der Expression der miR-133 ($p=0.0045$). Patienten, die sich in NYHA-Stadium I und II befinden weisen hohe miR-133-Expression auf. Dagegen ist eine niedrige miR-133-Expression mit den NYHA Stadien III und IV assoziiert (→ Abb. 51 B). Ein ähnliches Bild zeigt sich im Vergleich zur miR-208-Expression. Sehr hohe BNP-Konzentrationen (>1800 pg/ml) sind mit niedriger miR-208-Expression vergesellschaftet ($p=0,053$) (→ Abb. 51 C). Ferner ist die Expression bei Patienten in NYHA-

Stadium III und IV ($p=0,063$) wesentlich geringer, als bei Patienten mit mildereren Symptomen der Herzinsuffizienz (\rightarrow Abb. 51, D). Die Untersuchungen zur Korrelation der miR-1 zu klinischen Parametern ergeben keine signifikanten Ergebnisse.

4.8.5.

\rightarrow Abb. 51:

Korrelation der miRNA-Expression mit klinischen Parametern



\rightarrow Abb. 51:

Korrelation der miR-133- und miR-208-Expression mit den klinischen Parametern NYHA-Klassifizierung und NT-proBNP.

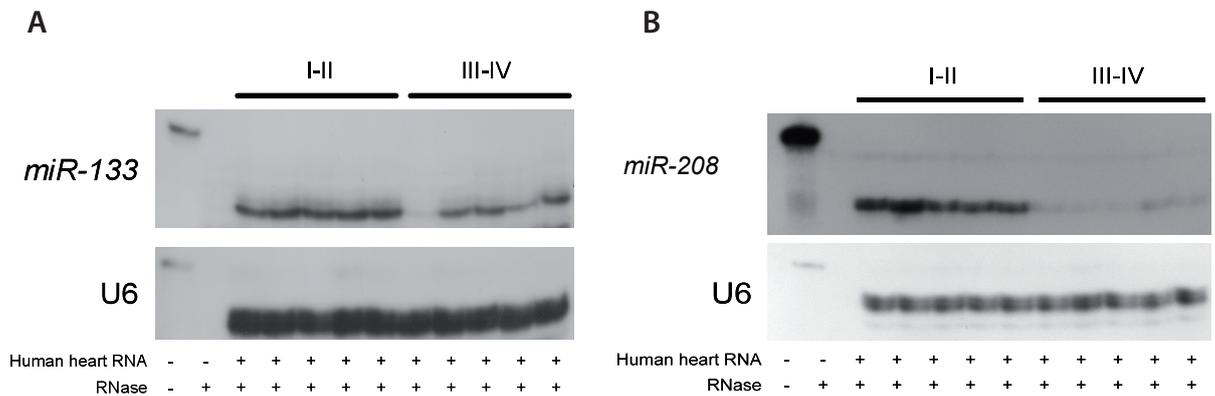
RNase protection Assay der miR-133 und miR-208

Als zusätzliches bildgebendes Verfahren wurde für die miR-133 und miR-208 der *RNase protection Assay* durchgeführt. Dazu wurden je 5 Proben von Patienten in NYHA-Stadium I und II gegen 5 Proben von Patienten in NYHA-Stadium III und IV gegeneinander aufgetragen. Die snRNA U6 wird in Säugerzellen ubiquitär und in hoher Transkriptionsrate exprimiert und dient zur Kontrolle der Transkriptions-

effizienz. Die Expression der U6 ist in allen untersuchten Proben (→ Abb. 52 A und B) identisch, wodurch die Proben miteinander vergleichbar sind. In Abbildung 52 A wird deutlich, dass die miR-133-Expression bei Patienten in NYHA-Stadium I und II stärker ist als deren Expression bei Patienten in NYHA-Stadium III und IV. Denn hier stellen sich die Banden deutlich schwächer dar, was für eine geringere Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde spricht und somit für weniger miR-133-Moleküle in der Probe (→ Abb. 52 A). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Testung der miR-208-Expression. Hier wird die niedrigere Expression der miR-208 bei Patienten in Stadium III und IV durch sehr schwache Banden noch deutlicher (→ Abb. 52, B). Patienten mit deutlichen Symptomen der Herzerkrankung weisen eine niedrige miRNA-Expression auf. Patienten mit geringen Symptomen der Herzerkrankung zeigen dagegen eine hohe Expression der miR-133 und miR-208. Die miR-133- und miR-208-Expression korreliert somit mit dem Grad der Herzinsuffizienz.

→ Abb. 52:

RNase protection Assay der miR-133 und miR-208



→ Abb. 52:

RNase protection Assay, Expression der miR-133 und miR-208 in Herzgewebe von je 5 Patienten in NYHA-Klasse I-II und 5 Patienten in NYHA-Klasse III-IV. Zusätzlich wurde die U6 als Kontrolle für die Transkriptionseffizienz mitgeführt. Spur 1 zeigt die Sonde ohne Hybridisierung an eine Probe und ohne Zugabe von RNase, Spur 2 zeigt den Verdau der Sonde nach RNase-Zugabe.

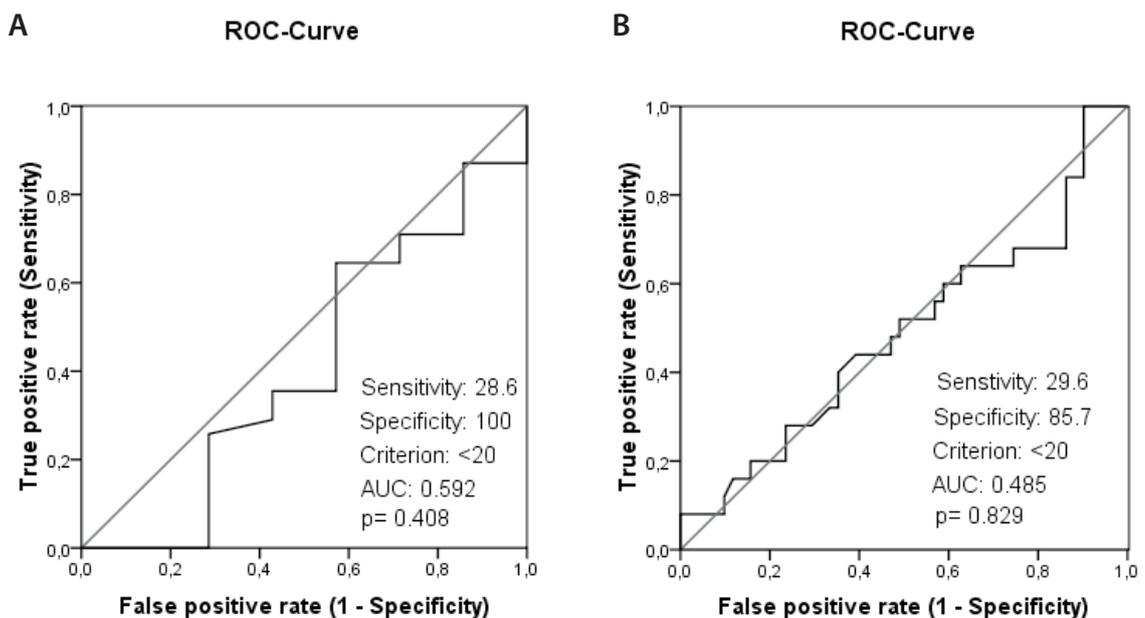
4.8.6.

ROC-Kurven-Analyse der mikroRNA-Expression in Assoziation mit der BNP-Konzentration im Blut und der NYHA-Klassifizierung

Die ROC-Kurven-Analyse wurde für die miR-1, miR-133a und miR-208 durchgeführt, um die Expression der miRNA kategorisieren zu können und anschließend in Korrelation zu hämodynamischen Parametern zu setzen. Die Testung der miR-1-Expression zeigte sowohl in Bezug auf die BNP-Konzentrationen, als auch die NYHA-Klassifizierung keine signifikante Assoziation (→ Abb. 53). Die Analyse der miR-133a-Expression ergab sowohl in der Assoziation zu BNP ($p=0,0243$) als auch zum NYHA-Stadium ($p=0,052$) einen *Cut-off*-Wert (Grenzwert) von Ct 21. Die jeweilige Spezifität und Sensitivität sind der Abbildung 54 zu entnehmen. Angewendet auf die miR-208-Expression zeigt sich eine Signifikanz in der Testung zu BNP ($p=0,014$), jedoch keine in Bezug auf die NYHA-Klassifizierung. Der *Cut-off*-Wert liegt hier bei 31 Ct (→ Abb. 55).

→ Abb. 53:

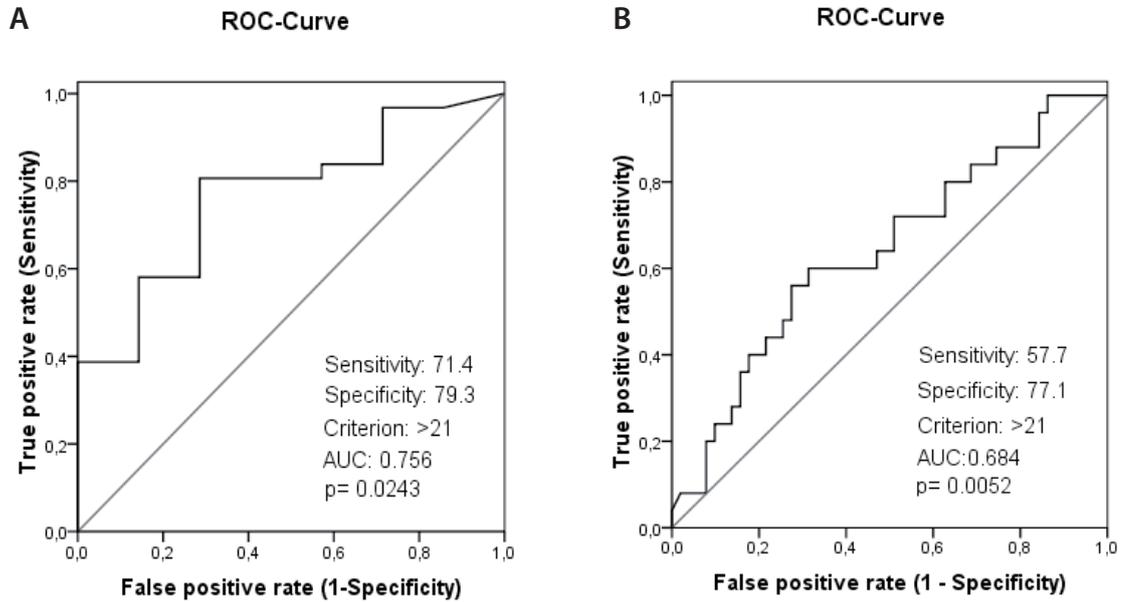
ROC-Kurven-Analyse der miR-1



→ Abb. 53:

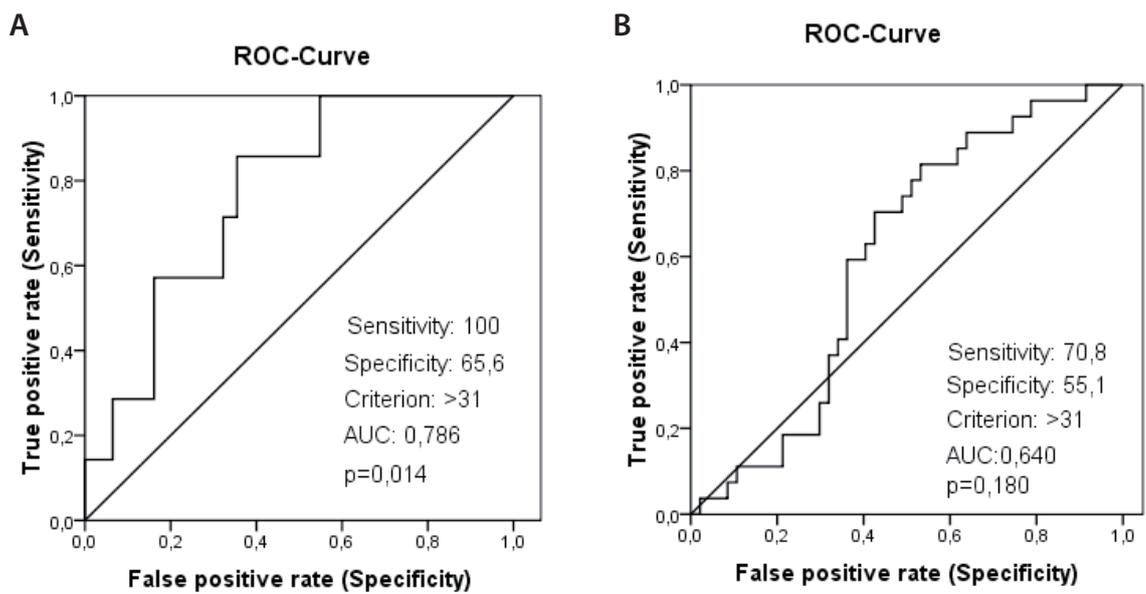
ROC-Kurven-Analyse der miR-1-Expression bei KHK-Patienten.

→ Abb. 54:
ROC-Kurven-Analyse der miR-133



→ Abb. 54:
ROC-Kurven-Analyse der miR-133-Expression bei KHK-Patienten.

→ Abb. 55:
ROC-Kurven-Analyse der miR-208



→ Abb. 55:
ROC-Kurven-Analyse der miR-208-Expression bei KHK-Patienten.

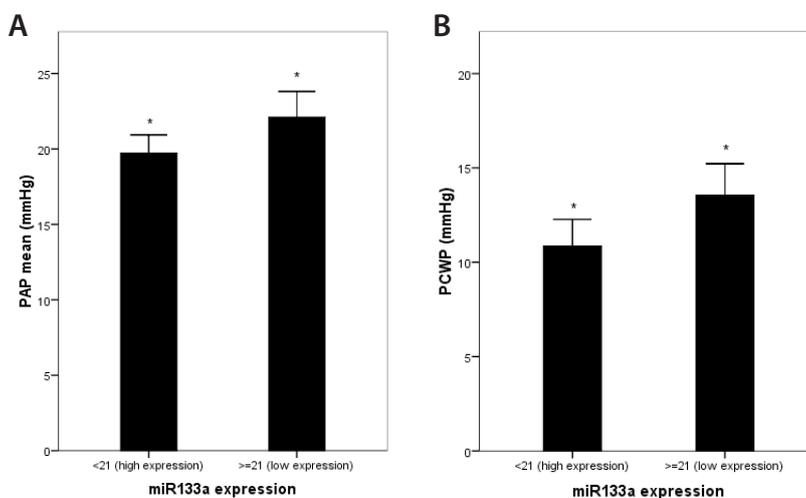
4.8.7.

Assoziation der mikroRNA-Expression mit klinischer Hämodynamik

Bei der Assoziation zu klinischen Parametern wurde die Expression der miR-1 nicht weitergehend untersucht, aufgrund der fehlenden Signifikanz in der ROC-Kurven-Analyse. Die Expression der miR-133a dagegen korreliert sowohl mit dem PAP ($p=0,018$) als auch mit dem PCWP ($p=0,022$). Patienten mit erhöhten pulmonalarteriellen und pulmonalkapillären Drücken weisen gleichzeitig eine niedrigere miR-133a-Expression auf. Patienten mit physiologischen oder nur leicht erhöhten hämodynamischen Parametern zeigen eine hohe miR-133a-Expression (→ Abb. 56, A und B). Es konnte somit eine Korrelation zwischen niedriger miR-133a-Expression und einem Anstieg hämodynamischer Drücke detektiert werden.

→ Abb. 56:

Assoziation der miR-133a-Expression zu hämodynamischen Parametern



→ Abb. 56:

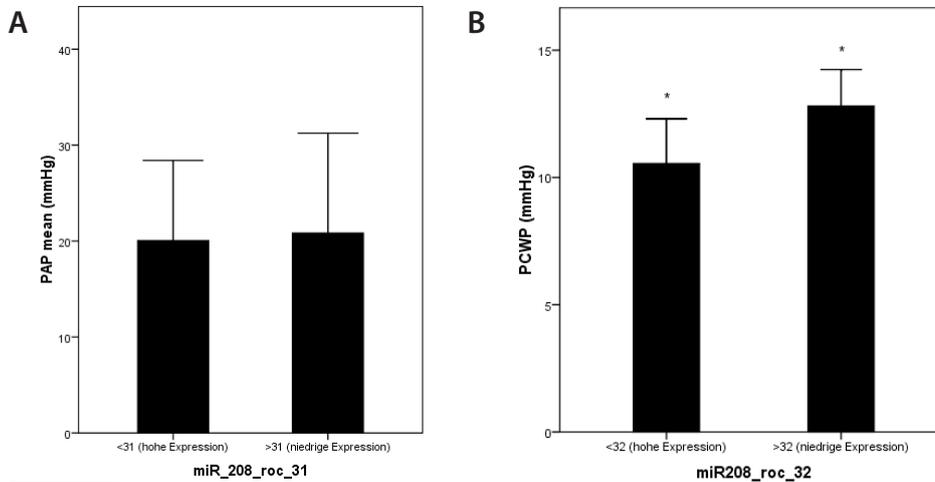
Korrelation der miR-133-Expression mit Parametern der klinischen Hämodynamik PAP

(A) und PCWP (B) bei KHK-Patienten. $*=p < 0,05$

Die Testung der miR-208-Expression in Bezug auf die gemessene Hämodynamik von KHK-Patienten ließ zunächst keine Korrelation zu Schwankungen des PAP zu (n.s.). Änderungen des PCWP dagegen zeigen eine deutliche Assoziation zur miR-208-Expression. Auch hier zeigen Patienten, ähnlich wie bei der Testung der miR-133a-Expression beobachtet, mit erhöhtem PCWP eine niedrige miR-208-Expression ($p=0,046$). Ein physiologischer oder leicht erhöhter PCWP geht mit hoher miR-208-Expression einher (→ Abb. 57 A und B).

→ Abb. 57:

Assoziation der miR-208-Expression zu hämodynamischen Parametern



→ Abb. 57:

Korrelation der miR-208-Expression mit Parametern der klinischen Hämodynamik

PAP (A) und PCWP (B) bei KHK-Patienten. *= $p < 0,05$

4.8.8.

In-silico-Analyse für Zielgene der miR-1, miR-133 und miR-208

Das Ergebnis der *In-silico*-Analyse ist in Tabelle 8 dargestellt. Dabei wurden die Ergebnisse verschiedener angewendeter Programme zusammengefasst, jedoch aufgrund der großen Anzahl der vorhersagbaren Gene auf die für diese Arbeit relevanten Gene reduziert. Die Testung erfolgte für die jeweiligen Zielgene der spezifische miRNA. Die *In-silico*-Analyse potentieller Zielgene für die miR-133a nach *miRNAMap* (<http://miRNAMap.mbc.nctu.edu.tw>) ergab eine potentielle Bindung der miR-133a an die 3`UTR der Gene *GRK5*, *CDC42*, *RGS4*, *RhoA*, *GNAi2*, *ADRA1*, *GNAQ* und *GRK2*. Zusätzlich postuliert die Analyse nach *miRNAMap* die miR-133a und b als Bindungssequenzen für die Gene *GRK5*, *GRK2* und *RGS4*.

→ Tab. 9:

Zielgen-Identifikation der miR-1, miR-133 und miR-208 durch *In-silico*-Analyse

miR-1	RGS4	GRK5						
miR-133	GRK5	CDC42	RGS4	RhoA	GNAi2	ADRA1	GNAQ	ADRBK1
miR-208	RGS4	NPPB						

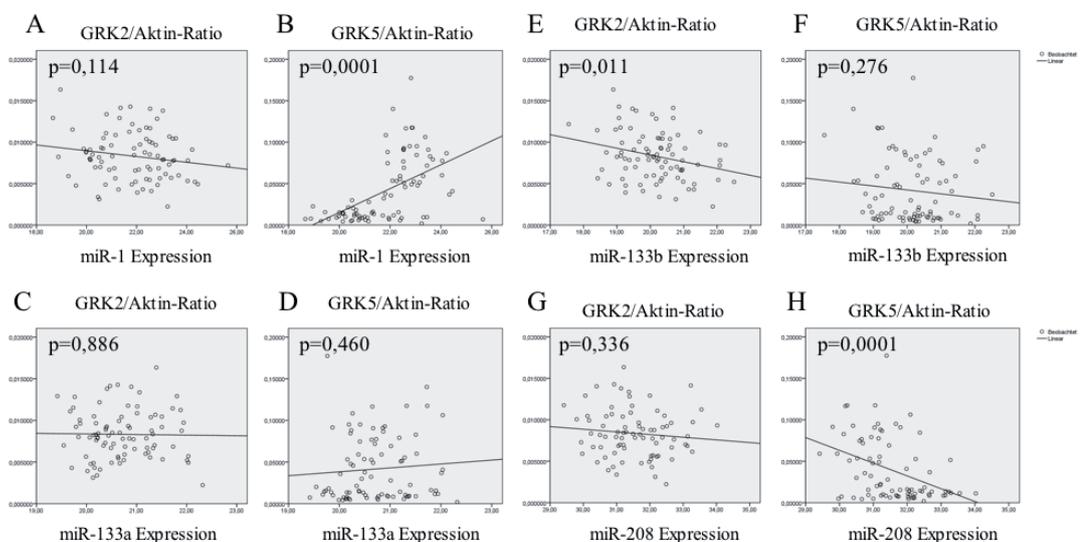
4.8.9.

Korrelation der mikroRNA-Expression mit der Expression kardio-vaskulär relevanter Gene

Um die Fragestellung nach einem Zusammenhang der GRK-Expression und kardio-vaskulär relevanter miRNAs zu testen, wurde zunächst eine mögliche Korrelation der miR-1, miR-133 und miR-208 mit den Genen *GRK2* und *GRK5* untersucht. Dabei wurden mRNA-Expression der Gene mit der jeweiligen miRNA-Expression assoziiert. Eine signifikante Korrelation besteht in der Expression der miR-1 und der des *GRK5*-Gens (Abb. 58, B). Hier fällt besonders auf, dass die mRNA-Expression von *GRK5* bei einem Ct-Wert von 22 sprunghaft ansteigt. Bei einem Ct <22 geht die mRNA-Expression nicht über 0,05. Zusätzlich wird deutlich, dass die mRNA-Expression mit einem Anstieg der miR-1-Expression abnimmt. Eine Abnahme der miR-1-Expression (<22 Ct) korreliert mit einem plötzlichen Anstieg der mRNA-Expression. Die Korrelation der miR-133b zur *GRK2*-Expression → (Abb. 58, E) verläuft dagegen in die andere Richtung. Hier sinkt die mRNA-Expression mit sinkender miR-133b-Expression. Ein ähnliches Bild zeigt sich im Vergleich der *GRK5*-Expression mit der miR-208-Expression (→ Abb. 58 H). Auch hier sinkt die *GRK5*-Expression mit sinkender miR-208-Expression.

→ Abb. 58:

Korrelation der *GRK2* und *GRK5* Expression mit spezifischer miRNA-Expression



→ Abb. 58:

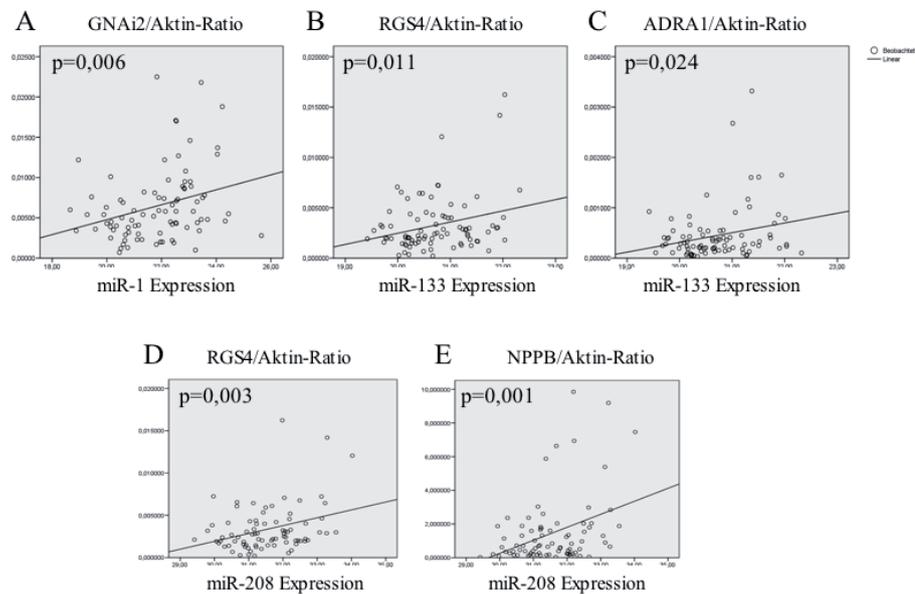
Korrelation der *GRK2*- und *GRK5*-Expression zur miR-1-, miR-133a-, miR-133b- und miR-208-Expression in Herzgewebe von KHK-Patienten.

Expression in Herzgeweben von KHK-Patienten

Zusätzlich wurde eine mögliche Korrelation der miRNA-Expression mit postulierten Zielgenen getestet. In Abbildung 59 sind lediglich die signifikanten Ergebnisse dargestellt. Dabei geht ein Anstieg der miR-1-Expression mit einem Rückgang der GNAI2-Expression einher ($p=0,006$), (\rightarrow Abb. 59, A). Ebenso ist ein Anstieg der miR-133a-Expression mit herabgesetzter Expression des RGS4- ($p=0,011$) und ADRA1-Gens ($p=0,024$) assoziiert. Eine niedrige Expression des RGS4- ($p=0,003$) und NPPB ($p=0,001$)-Gens korreliert mit einer vergleichbar hohen miR-208-Expression.

\rightarrow Abb. 59:

Korrelation der miRNA-Expression mit der Expression kardial-relevanter Gene in Herzgewebe von KHK-Patienten



\rightarrow Abb. 59:

Korrelation der miR-1-, miR-133- und miR-208-Expression zur Expression spezifischer Gene mit Bedeutung für das kardio-vaskuläre System bei KHK-Patienten.

5. DISKUSSION

5.1.

Die *GRK2*-Promotor- und 3'UTR-SNPs A(-1138)G, C(-1095)T, A(-43)G und A(+19,410)G

Um eine mögliche Ursache für interindividuelle Unterschiede bei *GRK2*-assoziierten Erkrankungen zu untersuchen, wurde der *GRK2*-Promotor und die für die miRNA Bindung wichtige 3'UTR zur Suche nach regulatorischen SNPs sequenziert. Dabei kam den, in dieser Arbeit neu identifizierten SNPs A(-43)G im Promotor und A(+19,410)G in der 3'UTR, eine besondere Bedeutung zu. Beide SNPs zeichnen sich durch einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin aus, welches die häufigste Art des Basenaustausches darstellt⁵³. Ihr seltenes Auftreten in den verschiedenen Ethnien (→ Tab. 7) spricht für eine hohe Konservierung der Sequenz in den untersuchten Bereichen. Dafür spricht ebenfalls das Fehlen der Mutation im getesteten Kollektiv von Afrikanern, was sie evolutionsgenetisch interessant macht. Durch die Tatsache, dass beide SNPs bisher noch nicht beschrieben wurden und dass ihr Auftreten nach den Ergebnissen dieser Arbeit sehr selten ist, ließen sich zwei Fragestellungen ableiten:

1. kann der SNP A(-43)G im Promotor bei Trägern des Minorallels zu einer Alteration der *GRK2*-Expression führen und somit *GRK2*-assoziierte Erkrankungen beeinflussen oder auch bedingen, indem er die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren verändert?
2. hat der in der 3'UTR identifizierte SNP Auswirkungen auf das Bindungsverhalten endogener miRNA bzw. spezifischer *Enhancer* oder *Silencer*, die ihrerseits die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren bzw. die Promotor-Aktivität beeinflussen?

Die Beeinflussung des Promotors und der 3` UTR durch den jeweiligen SNP wurde anhand des Proteinbindungsverhaltens (3.2) sowie der getesteten Promotor-Aktivität mittels *Luciferase-Assay* (EMSA) untersucht. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren wurde mittels der etablierten Methode des EMSAs nachgewiesen ohne dabei genauere Untersuchungen zu der Spezifität des Transkriptionsfaktors anzustellen. Aufgrund der Möglichkeit gewebsspezifischer Expressionsprofile des *GRK2*-Gens wurde der EMSA in zwei Zellsystemen durchgeführt. Neben den ubiquitär in jedem Zelltyp exprimierten Transkriptionsfaktoren gewährleisteten die zell- bzw. Gewebsspezifischen Transkriptionsfaktoren die charakteristische Ausstattung der Zelle mit zellspezifischen Proteinen¹⁵². Die Promotor-SNPs A(-1138)G und C(-1095)T zeigten hier keine messbaren Ergebnisse, was ihre Bedeutung für eine Beeinflussung der *GRK2*-Expression als sehr gering einstufen lässt. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Untersuchungen zu den SNPs A(-43)G und A(+19,410)G. Der Promotor SNP A(-43)G zeigte im Proteinbindungsverhalten sowohl für das A-Allel als auch für das G-Allel eine spezifische Bindung (→ Abb.17). Die Bandenhöhe beider spezifisch gebundener Sonden ist identisch, was auf die Bindung derselben oder gleich großer Transkriptionsfaktoren schließen lässt. Hier fällt jedoch auf, dass die Bindung an die G-Allel-Sonde ungleich stärker ist, als die der A-Allel-Sonde. Dies spricht für eine stärkere Bindung der Transkriptionsfaktoren an das G-Allel. Dies wird zudem im durchgeführten *Luciferase-Assay* (→ Abb. 20 B) sichtbar. Hier ist anzumerken, dass die Andeutung einer höheren Promotor-Aktivität bei Trägern des G-Allels im HEK293-Zellsystem (24 Stunden Wert) deutlich wird. Es stellt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitäten der Allele dar.

Im A10-Zellsystem gehen die Ergebnisse des EMSA ebenfalls mit den Ergebnissen des *Luciferase-Assays* einher. Es zeigte sich im EMSA unter Verwendung von A10-Zellkernextrakten keine Bindung von Transkriptionsfaktoren an Allel-spezifische-Sonden. Gleichzeitig sind in diesem Zellsystem auch keine Allel-abhängigen Aktivitätsunterschiede im Promotor zu erkennen (→ Abb. 20 C). Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Proteinbindungsverhalten lassen sich somit in Einklang mit den Ergebnissen des *Luciferase-Assay* bringen, wobei gezeigt werden konnte, dass die G-Allel-Variante des A(-43)G-SNP zu einer geringgradig stärkeren Bindung

von Protein führt. Dies kann eine mögliche Erklärung für die andeutungsweise stärkere Promotor-Aktivität im HEK293-Zellsystem sein. Aufgrund der fehlenden Signifikanz stellen diese Ergebnisse zunächst nur eine Tendenz dar, die bei Trägern des G-Allels eine erhöhte *GRK2*-Promotor-Aktivität und somit eine höhere Expression des Gens erwarten lässt.

Der 3' UTR-SNP A(+19,410)G zeigte in den durchgeführten funktionellen Untersuchungen sowohl unter *steady-state*, als auch unter Substanzstimulation keine Genotyp-abhängigen Unterschiede. Es konnte jedoch ein deutlicher Aktivitätsunterschied zwischen getesteten Zellsystemen beobachtet werden. Die Gesamtaktivität im A10-Zellsystem ist um den Faktor 10 niedriger als im HEK293-Zellsystem. Dies könnte mit einer unterschiedlichen Zusammensetzung von miRNAs oder *Silencern* in den Zellsystemen zusammenhängen. Ebenfalls fällt auf, dass die Aktivität der Konstrukte im Zeitverlauf von 6 zu 24 Stunden zunimmt (→ Abb. 21 C und D). In allen durchgeführten Untersuchungen zur Funktionalität dieses SNPs fällt auf, dass beide Konstrukte immer eine niedrigere Aktivität gegenüber des pMIR Vektors aufweisen (→ Abb. 21). Dies spricht für eine Regulierung der 3' UTR durch *Silencer* oder miRNAs, die die Aktivität negativ regulieren. Der für diesen SNP durchgeführte EMSA mit HASM-Zellkernextrakten zeigt eine spezifische Bindung von Protein für das A-Allel. Dabei handelt es sich um sehr kleine Proteine, da sie sich unterhalb der unspezifischen Banden befinden. Aufgrund dessen könnte es sich hierbei, um die Bindung von miRNAs handeln, die ebenfalls sehr kleine Moleküle darstellen.

5.2.

Untersuchungen zum *GRK5*-Promotor

Die durchgeführten Untersuchungen zum *GRK5*-Promotor zeigten zunächst eine höhere Aktivität im A10-Zellsystem. Die Aktivität der Konstrukte stellte sich im Vergleich zum HEK293-Zellsystem um den Faktor 6 höher dar (→ Abb. 27 und 28). Diese Beobachtung geht auch mit Literaturangaben einher, wobei die *GRK5*-Expression in Herzmuskelzellen am höchsten ist^{4,9}. Unabhängig vom Zellsystem konnte die Aktivitätsabnahme des -427 Promotor-Konstrukts beobachtet werden. Für die Gesamt-Promotor-Aktivität kann somit der Sequenzabschnitt zwischen Position -810 und -427 als entscheidend definiert werden. An diesen Abschnitt scheinen also Transkriptionsfaktoren zu binden, die die Promotor-Aktivität hochregulieren. Die Sequenz von Position -427 bis zum ATG scheint damit wenig Einfluss auf die Gesamt-Promotor-Aktivität auszuüben.

Eine Stimulation des Promotors mit Angiotensin II bewirkte unabhängig vom Zellsystem HEK293 ($p=0,0005$) und A10 ($p=0,0103$) einen Anstieg der Basalaktivität. Angiotensin II stimuliert AT1 Rezeptoren, die Substrate der *GRK5* darstellen. Daher gehen diese Beobachtungen mit der Literatur einher, die in vorrangegangenen Arbeiten einen Anstieg der *GRK5*-Expression bei Angiotensin II Stimulation beobachten konnte^{43,153}. Zusammen mit den Ergebnissen zu *GRK5*-Deletionskonstrukten, kann der Rückschluss auf die Bedeutung der Promotorsequenz von Position -810 bis -427 gezogen werden, an die *Enhancer* zu binden scheinen.

Kopplungsanalysen zu den identifizierten Promotor-SNPs ergaben drei Haplotypen des *GRK5*-Promotors: ATT, GCC und ACC. In Abhängigkeit vom Haplotyp zeigten sich im HEK293-Zellsystem (→ Abb. 39) Unterschiede in der Promotor-Aktivität ($p=0,0083$). Das Konstrukt mit dem Haplotyp ATT erreichte die höchste Aktivität. Hingegen erreichte das Konstrukt mit den Haplotyp ACC die niedrigste Aktivität. Dies war sowohl unter Basalbedingungen (FKS) als auch bei der Stimulation mit Forskolin ($p=0,005$) und Angiotensin II ($p=0,004$) zu detektieren. Diese Beobachtung verdeutlicht den Einfluss der Haplotypen auf die Promotor-Aktivität und die *GRK5*-Expression. Unter Il-8-Stimulation kam es zu einem Anstieg

der Aktivität des ATT-Konstrukts ($p=0,0058$), wobei die Aktivität des GCC- und ACC-Konstrukts unbeeinflusst blieb. Der Einfluss von Il-8 auf diesen Genotyp des *GRK5*-Promotors ist im Hinblick auf die *GRK5*-Expression bei einer Sepsis interessant. Arraes et.al.¹⁵⁴ untersuchten den intrazellulären Mechanismus, der bei Sepsis-Patienten neutrophile Granulozyten an der Migration hindert. Dabei zeigten die Patienten u.a. eine erhöhte Il-8- und TNF- α -Konzentration, die mit einer erhöhten *GRK5*-Expression in neutrophilen Granulozyten einhergeht. Die Untersuchung der Haplotypen im A10-Zellsystem zeigte zunächst eine um den Faktor 100 höhere Basalaktivität. Diese sehr hohe Grundaktivität könnte ein Grund für die fehlenden Aktivitätsunterschiede zwischen den Haplotypen sein. Eine Stimulation mit TNF- α zeigte eine niedrigere Aktivität des ACC-Haplotyps ($p=0,0079$), was diesen ebenfalls in Hinblick auf die Arbeit von Arraes et.al.¹⁵⁴ interessant macht.

Das Proteinbindungsverhalten der untersuchten Haplotypen lässt sich mit den im *Luciferase-Assay* beobachteten Ergebnissen vergleichen. Es zeigten sich für beide Allele der SNPs A(-1437)G und C(-1435)T deutliche Proteinbindungen, die sich im EMSA als nicht Genotyp-spezifisch darstellten (\rightarrow Abb. 44). Jedoch besteht eine Genotyp-abhängige Proteinbindung für den SNP C(-678)T, der das dritte Allel des Haplotyps darstellt. Hier ist für das C-Allel eine Doppelbande im EMSA mit HEK293-Zellkernextrakten zu erkennen, die bei der T-Allel-Sonde nicht zu identifizieren ist (\rightarrow Abb. 45). Diese zusätzliche Bindung von Protein an die C-Allel-Sonde könnte unter Einbeziehung der Ergebnisse aus dem *Luciferase-Assay* auf eine Bindung spezifischer *Silencer* deuten, da die Haplotypen GCC und ACC, eine signifikant niedrigere Aktivität zeigten als das ATT-Konstrukt. Dies wurde ebenfalls im HEK293-Zellsystem beobachtet. Die erhöhte Promotor-Aktivität des ATT-Haplotyps im Vergleich zum GCC und ACC-Haplotyp führt zu einer erhöhten Expression der *GRK5*. Ein Anstieg der *GRK5*-Expression führt bei einer langanhaltenden Aktivierung des SNS, wie bei einer KHK, zu einer erhöhten Desensibilisierung von β -Rezeptoren^{18,25}. In diesem Zusammenhang konnte bereits die Bedeutung der GRKs für die Entwicklung und Progression einer Herzinsuffizienz bewiesen werden^{10,41,43}. Bei ACVB-Operationen ist die Desensibilisierung zusätzlich gesteigert und macht perioperativ häufig den Einsatz positiv inotrop wirkender Pharmaka notwendig. Die Regulation der *GRK5*-Expression hat daher aktuelle Bedeutung.

Eine Genotypisierung der Patienten könnte eventuell dabei helfen, das Risiko für den Einsatz positiv inotrop wirkender Pharmaka einzuschätzen. Patienten mit dem Haplotyp ATT wären demnach einem größeren Risiko ausgesetzt mit positiv inotrop wirkenden Pharmaka behandelt werden zu müssen, als Patienten mit dem Haplotyp GCC oder ACC. Ebenso ist ein möglicher Therapieansatz in Hinblick auf die Transkriptionsfaktorbindungsstelle zur Diskussion zu stellen. Somit könnten Transkriptionsfaktorbindungsstellen je nach Genotyp inhibiert werden.

5.3.

Überblick zur miR-1, miR-133 und miR-208-Expression in verschiedenen Geweben

Die Expression genannter miRNAs in den untersuchten Geweben ist identisch zu mit den Angaben aus der Literatur. Die sog. *myomiRs* miR-1 und miR-133 wiesen im Skelettmuskel der Ratte die höchste Expression in den getesteten Geweben auf, wie bereits von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen dargestellt (→ vgl. Abb. 48). Zudem zeigte sich im Vergleich der miRNA-Expression (miR-1 und miR-133) ein nahezu identisches Expressionsmuster. Dies ist durch die gemeinsame Transkription dieser miRNAs zu erklären, die durch denselben Promotor in einer bicistronischen Einheit transkribiert werden. Die miR-208 ist in den untersuchten Geweben nicht zu detektieren, was die in der Literatur beschriebene Herzspezifität dieser miRNA verifiziert.

Die miRNA-Quantifizierung in Herzgewebe zeigte geringgradige Unterschiede in der miR-1- und miR-133-Expression. Dies ist durch die Beeinflussung der Expression durch unterschiedliche Transkriptionsfaktoren zu erklären. Beide miRNAs werden zwar von einer bicistronischen Einheit transkribiert und teilen sich einen Promotor, jedoch kann es durch Bindung sog. *upstream Enhancer* zu einer selektiven Expression der miR-1 bzw. miR-133 kommen. Diese *Enhancer* sind miR-1- spezifisch und führen zu dessen selektiver Expression. Dies erklärt geringfügige Abweichungen in deren Expression. Für eine gemeinsame Transkription spricht die Korrelation ($p=0,0004$) der relativen miRNA-Expressionen (→ Abb. 50, B).

Bei den Untersuchungen zur miR-208-Expression in Herzgewebe fällt auf, dass deren Konzentration weitaus geringer ist, als die der miR-1 und miR-133. Die miR-208 ist ab einem Ct-Wert von 28 quantifizierbar, wohingegen miR-1- und miR-133-Konzentrationen bereits ab einem Ct-Wert von 19 zu detektieren sind. Der Grund für diese im Vergleich deutlich niedrigere Konzentration dieser herzspezifischen miRNA kann in der kurzen Halbwertszeit (HWZ) der miR-208 liegen⁷². Die *mature Sequenz*, die mittels der angewendeten Assays detektiert werden soll, wird in der Literatur mit einer sehr kurzen HWZ beschrieben, weshalb deren Konzentration in untersuchtem Herzgewebe in Relation zur miR-1 und miR-133 gesetzt werden muss.

5.4.

Assoziation klinischer Herz-Kreislaufparameter und mikroRNA-Expression

In den vergangenen Jahren konnten bereits viele kardiologische Erkrankungen von unabhängigen Arbeitsgruppen in ihrer Ätiologie und Progression mit miRNA-Expression in Zusammenhang gebracht werden. Bisher wurde jedoch noch keine Assoziation zu ischämisch bedingten Herzerkrankungen, wie etwa bei ACVB-Patienten, untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten eine Assoziation klinischer Parameter der Herzinsuffizienz zur Expression kardial relevanter miRNAs identifizieren. Die Korrelation der miRNA-Expression in Herzgewebe von ACVB-Patienten zeigte sich in drei voneinander unabhängigen Parametern der Herzinsuffizienz. Zum einen in der anamnestisch erfassten NYHA-Klassifizierung und in der labor-diagnostisch erfassten NT-proBNP-Konzentration, als auch in zwei Parametern der klinischen Hämodynamik (PCWP, PAP). Für die hier untersuchten miRNAs zeigten sich unterschiedliche Assoziationen zu diesen Parametern. Die Korrelation der miRNA-Expression mit der NYHA-Klassifizierung stellte sich für die miR-133 als signifikant ($p=0,0045$) dar. Patienten in NYHA-Stadium I und II zeigten konsequent eine hohe miR-133-Expression. Bei Patienten in NYHA-Stadium III und IV konnte nur eine sehr geringe miR-133-Expression detektiert werden (→ Abb. 51 B). Ebenfalls konnten hohe NT-proBNP-Konzentrationen im Blut mit der miR-133-Expression

assoziiert werden. Hier zeigten Patienten mit hohen NT-proBNP-Spiegeln >1800 pg/ml eine deutlich niedrigere miR-133-Expression, als Patienten mit einer niedrigen NT-proBNP-Konzentration ($p=0,0131$), (\rightarrow Abb. 51, A). Interessanterweise konnte eine Korrelation zur miR-1-Expression und den untersuchten Parametern nicht beobachtet werden. Im Falle der miR-208 konnte eine Tendenz der miRNA-Expression und den Parametern NYHA-Klassifizierung und BNP-Konzentration beobachtet werden. Eine Änderung der miR-208-Expression scheint erst bei stärkeren Beeinträchtigungen der Herzleistungskraft beeinflusst zu werden. Hier zeigten lediglich Patienten in NYHA-Stadium III und IV eine niedrigere miR-208-Expression, die jedoch nicht signifikant ist ($p=0,063$). Ähnlich stellt sich die Expression bei Betrachtung der BNP-Spiegel dar. Erst bei BNP-Konzentrationen >1800 pg/ml ließ sich auch eine deutliche Senkung der miR-208-Expression beobachten ($p=0,053$), (\rightarrow Abb. 51 C und D). Änderungen der miR-208-Expression scheinen somit erst ab einem höheren Grad der Herzinsuffizienz detektierbar zu sein. In einem zusätzlichen bildgebenden Verfahren (*RNase protection Assay*) konnten diese Ergebnisse verifiziert werden. Auch hier zeigten Patienten in NYHA-Stadium I und II eine hohe miR-133-Expression und vice versa. In Bezug auf die miR-208-Expression, werden die Ergebnisse unterstützt. Auch hier ist die Expression in NYHA-Stadium III und IV deutlich herabgesetzt. Die Expression der miR-133 und miR-208 stellt sich nach diesen Ergebnissen als umgekehrt proportional zum Grad der Herzerkrankung dar. Die Expression der miR-1 scheint aufgrund fehlender Korrelation wenig Einfluss auf den Verlauf ischämisch bedingter Herzerkrankungen zu haben. Patienten mit deutlichen Symptomen der Herzerkrankung weisen somit niedrige miR-133- und miR-208-Expression auf. Patienten mit geringen Symptomen der Herzerkrankung zeigen dagegen eine hohe Expression der miR-133 und miR-208. Die Assoziation zur klinischen Hämodynamik zeigte ebenfalls eine Korrelation zur miR-133- und miR-208-Expression. Im Falle der miR-133 korreliert sowohl ein hoher PAP ($p=0,018$) als auch ein pathologischer PCWP ($p=0,022$) mit einer niedrigen miR-133-Expression. Die miR-208-Expression dagegen korreliert mit einem erhöhten PCWP ($p=0,046$). Eine Korrelation zum PAP konnte nicht beobachtet werden. Der Grund dafür könnte in der zusätzlichen Beeinflussung des PAP durch pulmonale Parameter liegen. Zudem scheint die miR-208-Expression, wie schon in der Korrelation zu BNP-Konzentrationen gezeigt, erst ab einem bestimmten Grad der

Herzerkrankung negativ reguliert zu werden, so dass eine Senkung ihrer Expression eventuell erst durch eine deutlichere Zunahme der pulmonalarteriellen Drücke beeinflusst wird. Ein Anstieg hämodynamischer Drücke, die eine Überbelastung des Herzens anzeigen, gehen also mit einer niedrigen miR-133-Expression und im Falle eines Anstiegs des PCWP auch mit einer niedrigen miR-208-Expression einher. Diese Ergebnisse zeigen erstmalig eine Korrelation kardial-relevanter miRNAs und einer ischämisch bedingten Herzerkrankung und gibt einen Überblick der miRNA-Expression in unterschiedlichen Stadien der Herzinsuffizienz. Die miR-133- und miR-208-Expression nimmt in der Progression der Erkrankung ab. Des Weiteren ist eine niedrige miR-133- und miR-208-Expression mit einer herabgesetzten kardialen Leistungskraft assoziiert, wohingegen keine Assoziation zur miR-1-Expression besteht. Dies ist interessant, da eine deutliche Korrelation zwischen der Expression der miR-133 und miR-1 besteht (→ Abb. 50, B). Ein Grund für diese fehlende Assoziation der miR-1-Expression zur Herzinsuffizienz kann in der Beeinflussung unterschiedlicher Zielgene der miR-1 und miR-133 liegen. Daher ist eine Zielgene-Identifizierung für die jeweilige miRNA von Bedeutung. Des Weiteren werden miRNAs als prognostische oder diagnostische Marker postuliert. In diesem Falle würden die miR-133 und miR-208 als Marker für eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz diskutiert werden. Ein in Zukunft therapeutischer Einsatz von miRNAs setzt eine genaue Identifizierung der spezifischen Zielgene voraus. Ferner könnten Hinweise auf mögliche Zielgene der miRNAs entscheidend für die Risikoabschätzung einer Herzerkrankung oder deren Prognose sein.

5.5.

Identifizierung potentieller Zielgene der miR-1, miR-133 und miR-208

Nach einer *In-silico*-Analyse potentieller Zielgene, für die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs, konnte eine Assoziation zwischen miRNA-Expression und mRNA Quantität spezifischer Gene in Herzgewebe von ACVB-Patienten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse geben wichtige Hinweise für eine Regulierung der Gene durch herzspezifische miRNAs. Es konnte für die miR-1 eine starke Kor-

relation ($p=0,0001$) zur GRK5-mRNA-Expression beobachtet werden (\rightarrow Abb. 58), die mit der Zielgenvorhersage übereinstimmt. Der sprunghafte Anstieg der GRK5 mRNA ist hier von besonderem Interesse. Hier scheint es in Herzgewebe mit niedriger miR-1-Expression ($Ct=22$) zu einer deutlichen Zunahme der GRK5-mRNA zu kommen. Eine höhere miR-1-Expression ($Ct<22$) geht dagegen mit sehr niedriger GRK5-Expression einher. Zusammen mit der *In-silico*-Analyse zeigen diese Ergebnisse eine mögliche Regulierung der GRK5 durch die miR-1 an. Dies müsste für eine eindeutige Identifizierung der *GRK5* als Zielgen jedoch in Co-Transfektionsversuchen verifiziert werden. Dabei wird die entsprechende miRNA direkt in Zellen transfiziert und anschließend wird die mRNA-Konzentration des jeweiligen Gens mit und ohne miRNA-Transfektion detektiert. Sinkt die mRNA-Konzentration nach Co-Transfektion der miRNA unter den Vergleichswert, ist von einer Regulierung des Gens durch die transfizierte miRNA auszugehen. Eine Regulierung der GRK5 durch die miR-1 wäre für den Verlauf einer Herzinsuffizienz von großer Bedeutung, denn es konnte bereits gezeigt werden, dass die GRK5-Expression bei einer Überbelastung des Herzens ansteigt. Eine Regulierung durch die miR-1 könnte wichtige Aussagen über die Prognose und das Ansprechen auf eine Therapie zulassen. Falls ein Patient eine hohe miR-1-Expression zeigt, könnte von einer herabgesetzten *GRK5*-Expression ausgegangen werden. Dies wiederum würde eine höhere Dichte an β -Rezeptoren bedeuten und ein verbessertes Ansprechen auf eine Therapie. Des Weiteren konnte eine Korrelation zur miR-1-Expression und *GNAi2*-Expression beobachtet werden ($p=0,006$) (\rightarrow Abb. 58). Auch hier geht eine hohe *GNAi2*-Expression mit einer niedrigen miR-1-Expression einher. *GNAi2* wurde bereits in Zusammenhang mit einer Suppression von β -Rezeptoren in Kardiomyozyten gebracht. Eine Überexpression von *GNAi2* bewirkte eine herabgesetzte Signalweiterleitung bei β -Rezeptoraktivierung bei einer Herzinsuffizienz¹⁵⁵. Der Grund für eine *GNAi2*-Überexpression bei einer Herzinsuffizienz konnte jedoch noch nicht bestimmt werden. Die Identifizierung des *GNAi2* als Zielgen für die miR-1 wäre eine mögliche Erklärung. Bei einer verminderten Expression der miR-1 würde es zu einer Überexprimierung des *GNAi2* kommen. Eine verminderte Expression der miR-1 konnte bereits bei der dilatativen Kardiomyopathie und bei der Aortenstenose beobachtet werden⁹⁸. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer hohen Expression der miR-133. Diese korrelierte mit einer herabgesetz-

ten RGS4-($p=0,011$) und ADRA1-($p=0,024$) Expression. RGS-Proteine besitzen eine besondere Bedeutung für die kardiale Funktion. Sie aktivieren die GTPase und beeinflussen so die GPCR-Signalkaskade¹⁵⁶. Es konnte gezeigt werden, dass die RGS4-Expression sowohl im Tiermodell bei einer Herzhypertrophie als auch bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie erhöht ist^{157,158}. Zudem wurde eine posttranskriptionelle Regulation postuliert. Gleichzeitig konnte in Bezug auf die miR-133-Expression eine herabgesetzte Expression der miR-133 bei der Herzhypertrophie beobachtet werden^{71,72,159}. Diese Ergebnisse würden somit eine Regulierung des GNAi2-Gens durch die miR-133 unterstützen. Eine Korrelation mit dem RGS4-Gen wurde in dieser Arbeit auch mit der Expression der miR-208 beobachtet ($p=0,003$). Eine hohe miR-208-Expression geht hier ebenfalls mit einer Abnahme der RGS4-Expression einher. Dies verdeutlicht den Einfluss von miRNAs auf ein gesamtes Gen-Netzwerk, da eine Vielzahl von miRNAs ein Gen, aber auch mehrere Gene von einer miRNA reguliert werden können. So kann auf komplexe Weise der Krankheitsphänotyp modifiziert werden. Ein weiteres potentielles Zielgen konnte für die miR-133 identifiziert werden, welches eine besondere Bedeutung in Hinblick auf eine Hypertension besitzt und somit entscheidend ist für die Entlastung des Herzens bei einer Insuffizienz. Es handelt sich hierbei um das Gen *ADRA1*, welches für α_1 -Rezeptoren kodiert. Auch hier wurde eine hohe miR-133-Expression mit einer niedrigen *ADRA1*-Expression assoziiert ($p=0,024$). Eine Regulierung des *ADRA1* durch die miR-133 würde die in der Literatur beschriebene, modulatorische Rolle der miR-133 bei der Herzhypertrophie erklären. Wie bereits erwähnt konnte ein Abfall der miR-133-Expression bei einer Hypertrophie belegt werden. Bei der Entstehung einer Hypertrophie spielt u.a. der periphere Widerstand eine Rolle, der vornehmlich über α_1 -Rezeptoren reguliert wird. Als Zielgen der miR-133 würden bei niedriger miR-133-Expression also vermehrt α_1 -Rezeptoren exprimiert werden, da eine negative Regulation durch die miRNA herabgesetzt wäre. Dies erhöht den peripheren Widerstand und beschleunigt die Pathogenese der Erkrankung. Die Korrelation der miR-208-Expression mit der des BNP-Gens (NPPB) ist in dieser Arbeit von besonderem Interesse, da die Korrelation durch die Ergebnisse der klinischen Assoziation mit der miR-208-Expression belegt werden. Auch hier zeigte sich bei einer hohen miR-208-Expression eine erniedrigten BNP-Expression ($p=0,001$). Dies zeigte sich zudem im *RNase protec-*

tion Assay, sowie in der Korrelation zur BNP-Konzentration im Blut. Des Weiteren wurde in der Literatur eine wichtige Funktion der miR-208 bei miR-208-Knockout-Tieren beschrieben. Bei diesen Tieren wurde eine starke Hochregulierung des BNP beobachtet⁸¹. Eine Regulation des NPPB durch die miR-208 ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit als sehr wahrscheinlich zu betrachten, so dass eine experimentelle Validierung von grossem Interesse wäre. Dies könnte in Co-Transfektionsversuchen validiert werden.

5.6.

Relevanz der Ergebnisse für die Veterinärmedizin

Die Herzinsuffizienz stellt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine bedeutende Erkrankung dar, die sich in ihrer Manifestation zwischen den Organismen Mensch und Tier vergleichen lässt. Ebenso zeigt sich ein nahezu identischer Pathomechanismus bei der Ausbildung einer Herzinsuffizienz. Die Häufigkeit kardialer Erkrankungen bei Hund und Katze machen die Ergebnisse dieser Arbeit auch für die Veterinärmedizin interessant. Bei 8 % der Hunde ist eine kardiale Erkrankung Todesursache⁹⁹. In dieser Arbeit wurden zwei bedeutende Aspekte in Zusammenhang mit Herzinsuffizienz untersucht. Zum einen deren Beeinflussung durch GRKs zum anderen miRNAs. GRKs besitzen aufgrund ihrer Regulierung von β -Rezeptoren eine besondere Bedeutung bei der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz. Auch bei Hunden mit experimentell erzeugter Herzinsuffizienz konnte eine Abnahme der β -Rezeptordichte (nicht differenziert nach β_1 und β_2) nachgewiesen werden¹¹¹. Ferner wurde eine selektive Abnahme der kardialen β_1 -Rezeptoren bei Hunden mit natürlich erworbener DCM nachgewiesen¹¹² sowie eine Desensibilisierung von β_2 -Rezeptoren¹¹³. Die Regulierung der β -Rezeptoren erfolgt auch hier durch GRKs. Bei Hunden konnte der Zusammenhang einer Herzerkrankung mit einem Anstieg der GRK2-Aktivität beobachtet werden¹²⁴. Aufgrund der starken Rassedisposition der DCM bei großen Hunderassen wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob genetische Varianten des Promotors (SNPs) des caninen *GRK2*- und *GRK5*-Gens einen Einfluß auf die GRK-Aktivität besitzen und somit die Progression einer Herzinsuffizienz beeinflussen können. Bisher gibt es jedoch

keine Untersuchungen zu SNPs im *GRK2*- oder *GRK5*-Promotor beim Tier. Die in dieser Arbeit neu identifizierten SNPs A(-43)G im Promotor des *GRK2*-Gens und A(+19,410)G in der 3`UTR zeigen ein seltenes Auftreten in verschiedenen Ethnien (→ Tab. 7) was für eine enge Regulation der GRK2 spricht. Die Sequenz der Gene ist unter den Spezies in hohem Maße konserviert (→ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=homologene&dopt=HomoloGene&list_uids=1223). Die identifizierten SNPs könnten durch eine Sequenzierung des *GRK2*-Gens im caninen Genom auf ihre Häufigkeit getestet werden, wobei bei einer Validierung die Ergebnisse zu diesen SNPs übertragen werden könnten. Ähnliches trifft auf Ergebnisse der Untersuchungen zum *GRK5*-Gen zu. Um die jeweiligen Ergebnisse übertragen zu können, ist eine Haplotypanalyse des caninen *GRK5*-Promotors durchzuführen. Da es sich bei der GRK2 und GRK5 um homologe Proteine mit identischer Funktion in Säugerorganismen handelt, kann von einer deutlichen Übereinstimmungen in der Beeinflussung der GRKs durch Pharmaka ausgegangen werden, weshalb auch die Ergebnisse der Stimulationsversuche eine Bedeutung für die Veterinärmedizin besitzen.

Bislang wurden in der Veterinärmedizin nur wenige Studien zu kardialen miRNAs durchgeführt. Die Ergebnisse zur miRNA-Expression in verschiedenen Geweben besitzt speziesübergreifende Bedeutung für die gewebsspezifische Expression der miR-1, miR-133 und miR-208 (→ Abb. 48). In Bezug auf porcine miRNAs konnte bereits herausgestellt werden, dass die miRNAs miR-1, miR-133 und miR-208 auch beim Schwein herzspezifische miRNAs darstellen¹²⁸.

Weiterhin sind die Ergebnisse zur Assoziation der miRNA-Expression und klinischen Herz-Kreislaufparametern von veterinärmedizinischem Interesse. Die klinische Symptomatik der ACVB-Patienten kann mit der einer DCM bei Hunden verglichen werden. Die DCM stellt die zweithäufigste kardiale Erkrankung beim Hund dar¹⁰⁵. Auch bei einer DCM durchlaufen die Hunde unterschiedliche Stadien der Herzinsuffizienz, wobei die Ätiologie bei einem Großteil der Patienten eine andere ist. Pathologische Veränderungen der Koronargefäße stellen bei Hunden eine eher seltene Erkrankung dar. Im Allgemeinen haben arteriosklerotische Veränderungen der Koronargefäße bzw. eine chronische KHK bei Tieren nur eine sehr geringe klinische Bedeutung. Studien zur Arteriosklerose wurden beim Hund durchgeführt, wobei im Rahmen einer Autopsie eine systemische Arteriosklerose bei 21 Hunden in einem Zeitraum von 13 Jahren diagnostiziert wurde. Histologische Untersuchungen stellten Infarktareale im Myokard fest¹⁶⁰. Weitere Studien an Hunden konnten ähnliche Veränderungen feststellen unter anderem auch Veränderungen an den Koronararterien¹⁶¹. Um die Korrelation der miRNA zu NYHA-Stadien (→ Abb. 51) zwischen den Spezies vergleichen zu können, wurde die in dieser Arbeit verwandte NYHA-Klassifizierung der ISACHC gegenüber gestellt (→ Tab. 2)¹⁴⁰. Ebenfalls stellt das Ergebnis der Korrelation der BNP-Konzentration zur miR-208 für die Veterinärmedizin ein interessantes Ergebnis dar. Entsprechend den Erfahrungen aus der Humanmedizin konnten bei Hunden sowohl in experimentellen Studien¹²⁹ als auch bei Tieren mit natürlich erworbenen Herzerkrankungen^{130,131} erhöhte Spiegel von natriuretischen Peptiden nachgewiesen werden^{132,133}. Auch hier gehen erhöhte BNP-Spiegel mit der Ausbildung einer symptomatischen DCM oder CVHD einher^{131,134,135}. Außerdem korrelieren diese mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung¹³⁶. Zudem zeigt sich die Sequenz der miR-208 zwischen Mensch und Hund zu 100 % identisch (→ Tab. 1). Weiterführende Untersuchungen zur Regulation des *NPPB* durch die miR-208 wären von aktueller Bedeutung für die Veterinärmedizin.

Die Korrelation der miRNA-Expression zum PAP und PCWP ist nur bedingt auf die Veterinärmedizin zu übertragen. Zwar ist bei einer Herzinsuffizienz auch beim Hund von einem Anstieg des PAP und des PCWP auszugehen, jedoch erfolgt die Messung dieser hämodynamischen Drücke unter Praxisbedingungen kaum. Eine experimentelle

Validierung wäre hier angezeigt und in Korrelation zur miRNA-Expression zu setzen. Die Zielgenidentifizierung der untersuchten miRNAs ist in Hinblick auf die Rasseprädisposition der DCM von besonderem Interesse. Von der DCM sind häufiger mittelgroße und große Hunderassen wie Irish Wolfhound, Dogge, Dobermann, und Boxer betroffen. Als ursächlich werden u.a. genetische Faktoren diskutiert¹⁰⁷. Da eine erhebliche Prädisposition der genannten Hunderassen besteht, ist von einer dominierenden Rolle der genetischen Faktoren bei der Pathogenese der Erkrankung auszugehen. Dahingehend könnten SNPs in der 3' UTR des Zielgens zu einer Veränderung der miRNA Bindungsstelle führen und somit eine Regulation durch die jeweilige miRNA verhindern. Die Folge wäre eine erhöhte Expression des Zielgens. Dies könnte je nach Zielgen das Risiko einer DCM erhöhen. Tiere mit Rasseprädisposition für eine DCM könnten vor dem Zuchteinsatz auf entsprechende SNPs getestet werden.

Es handelt sich sowohl bei der Herzinsuffizienz, als auch bei den Untersuchungen zum *GRK2*- und *GRK5*-Gen sowie der kardialen miRNAs, um klinische und in Zukunft vielleicht auch therapeutisch relevante Forschungsgebiete. Ergebnisse dieser Arbeit können zu weiterführenden Studien anregen, die sowohl die miRNA-Expression betreffen als auch die Identifizierung potentieller Zielgene. In der Veterinärmedizin stellt sich die Frage nach rassebedingten Unterschieden (SNPs) im *GRK2*- und *GRK5*-Promotor und deren 3' UTR sowie in der miRNA-Expression. Diese Ergebnisse könnten das vermehrte Auftreten der DCM bei großen Rassen erklären.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die chronische Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten Erkrankungen in den Industrieländern dar. Als Ursache kann in einem Großteil der Fälle die koronare Herzerkrankung (KHK) angesehen werden. Bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen spezifische Adaptationsmechanismen wie z.B. die Desensibilisierung von β -Rezeptoren des Herzens eine entscheidende Rolle²⁸⁻³⁰. Sie gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und werden von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) reguliert⁴. Weiterhin stellen sie primäre Zielmoleküle therapeutischer Substanzen dar³.

Die Desensibilisierung von β -Rezeptoren wird vornehmlich durch die GRK2 und GRK5 vermittelt^{5,11,153}. Da eine Änderung ihrer Expression direkte Auswirkungen auf das Ausmaß der β -Rezeptor-Desensibilisierung hat, kommt der Regulation ihrer Expression eine besondere Bedeutung zu. Die Expression der GRK-Enzyme wird über den Promotor und die 3' untranslatierte Region (3' UTR) reguliert. Die Promotor-Aktivität kann durch regulatorische *single nucleotide Polymorphisms* (SNPs) beeinflusst werden. Eine posttranskriptionelle Genregulation erfolgt u.a. über die Bindung spezifischer mikroRNAs (miRNAs) an die 3' UTR des Gens.

Darüber hinaus wird seit einigen Jahren wird der Einfluss spezifischer miRNAs auf pathologische Veränderungen am Herzen diskutiert^{79,81,159}. Hervorzuheben sind hier die muskelspezifischen miRNAs miR-1, miR-133 und miR-208. Bislang ist jedoch nichts über deren Bedeutung bei ischämisch bedingter Herzinsuffizienz in Folge einer KHK bekannt. Aufgrund der Bedeutung der kardialen Expression der GRKs und miRNAs leiten sich folgende Hypothesen ab, die in dieser Arbeit geprüft wurden:

- 1) In *GRK2*- und *GRK5*-Promotoren existieren regulatorische SNPs, welche die Expression der GRK-Enzyme beeinflussen.
- 2) Die Promotoren des *GRK2*- und *GRK5*-Gens sind konstitutiv aktiv und können durch spezifische Stimulation weiter induziert werden.

- 3) Die GRK5-Expression kann durch Regulation der GRK5-mRNA posttranskriptionell beeinflusst werden. Dies erfolgt durch miRNAs, die die mRNA-Konzentration beeinflussen.
- 4) Es besteht eine Korrelation kardial exprimierter miRNAs zur GRK2- und GRK5-Expression sowie weiteren kardial-exprimierten Genen, die potentielle Zielgene darstellen können.
- 5) Die Expression kardial-exprimierter miRNAs ist assoziiert mit klinischen Parametern der Herzinsuffizienz.

Zu 1) und 2): Der *GRK2*- und *GRK5*-Promotor wurde sequenziert und auf regulatorische SNPs untersucht. Im Promotor des *GRK2*-Gens wurden drei SNPs identifiziert. Die bereits validierten SNPs G(-1138)A (rs10791901) und C(-1095)T (rs11605263) sowie der bislang nicht beschriebene SNP A(-43)G. Es folgten funktionelle Untersuchungen der SNPs mittels *Luciferase-Assay* im HEK293- und A10-Zellsystem. Keiner der SNPs zeigte signifikante Unterschiede in der Beeinflussung der Promotor-Aktivität.

Für die Charakterisierung des *GRK5*-Promotors wurden Deletionskonstrukte generiert. Der Sequenzabschnitt zwischen Position -810 und -427 konnte für die Gesamt-Promotor-Aktivität als essentiell definiert werden. Eine *In-silico*-Analyse identifizierte in diesem Bereich die Familie der *human and murine ETS1 factors* als mögliche Transkriptionsfaktoren. Eine putative Bindung erfolgt u.a. im Bereich um die Position -678 des *GRK5*-Promotors.

Im *GRK5*-Promotor wurden sechs SNPs identifiziert: A(-1437)G (rs10787929), C(-1435)T (rs7923896), T(-1091)C (rs1397615), C(-678)T, G(-394)T (rs10886423) und C(-54)T (rs2230347). Der SNP C(-678)T wurde bisher nicht beschrieben und ist nicht in der Datenbank verzeichnet. Nach durchgeführter Haplotypanalyse zeigte sich eine Kopplung folgender SNPs: A(-1437)G, C(-1435)T und C(-678)T mit den daraus resultierenden Haplotypen ATT (Häufigkeit bei Kaukasiern 58,9%), ACC (Häufigkeit bei Kaukasiern 40%) und GCC (Häufigkeit bei Kaukasiern 1,1%). Stimulationsversuche identifizierten den Haplotyp ATT im HEK293-Zellsystem als Haplotyp mit der höchsten Promotor-Aktivität ($p=0,0083$). Ferner konnte bei der Stimulation mit Forskolin ($p=0,005$), Angiotensin II ($p=0,004$) und Interleukin-8 ($p=0,0058$) im HEK293-Zellsystem eine höhere Promotor-Aktivität des ATT-Ha-

plotyps im Vergleich zu den Haplotypen ACC und GCC detektiert werden.

Zu 3) und 4): Die mRNA-Expression der GRK2 und GRK5 sowie weiterer kardial-relevanter Gene wurde mittels Real-time PCR in Herzgewebe bestimmt und mit der Expression kardialer miRNAs assoziiert. Signifikante Korrelationen konnten bei folgenden Genen (Gen:miRNA) identifiziert werden:

GRK2 : miR-133 (p=0,011), GRK5 : miR-208 (p=0,0001), GRK5 : miR-1 (p=0,0001), NPPB : miR-208 (p=0,001), RGS4 : miR-133 (p=0,011), RGS4 : miR-208 (p=0,003), ADRA1 : miR-133 (p=0,024), GNAi2 : miR-1 (p=0,006).

Zu 5): Es wurde die Expression der miR-1, miR-133 und miR-208 in Herzgewebe von KHK-Patienten detektiert und eine Korrelation mit klinischen Parametern der Herzinsuffizienz untersucht. Die miR-1-Expression zeigte keine signifikanten Assoziationen mit klinischen Herzinsuffizienz-Variablen. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die miR-133-Expression mit voneinander unabhängig erhobenen, klinischen Parametern der Herzinsuffizienz korreliert: der anamnestisch erhobenen *New York Heart Association* (NYHA)-Klassifizierung (p=0,0045), der labordiagnostisch gemessenen NT-proBNP-Konzentration (p=0,0131) sowie dem hämodynamisch erfassten *pulmonary artery pressure* (PAP) (p=0,018) und dem *pulmonary artery wedge pressure* (PCWP) (p=0,022). Bei diesen Ergebnissen ist eine niedrige miR-133-Expression mit den NYHA-Klassen III und IV, einer NT-proBNP-Konzentration >1800 pg/ml sowie erhöhtem PAP und PCWP assoziiert. Dies wurde durch das bildgebende Verfahren des *RNase protection Assay* validiert. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Korrelation der Parameter zur miR-208-Expression. Auch hier zeigte sich eine Assoziation niedriger miR-208-Expression zu den NYHA-Klassen III und IV (p=0,063), der NT-proBNP-Konzentration >1800 pg/ml (p=0,053) und einem erhöhten PCWP (p=0,046). Es konnte keine Korrelation zum PAP identifiziert werden.

Zusammenfassend zeigte sich bei der Prüfung der Hypothesen 1) und 2), dass die identifizierten SNPs im *GRK2*-Gen keinen Einfluss auf die *GRK2*-Promotor-Aktivität besitzen.

Die Charakterisierung des *GRK5*-Promotors konnte den Sequenzabschnitt zwischen Position -810 und -427 als essentiell für die Promotor-Aktivität herausstellen, die nach *In-silico*-Analyse eine potentielle Bindungsstelle für die Familie der

human and murine ETS1 factors beinhaltet. Diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren konnte bereits mit der Gefäßhypertrophie bei Hypertension in Zusammenhang gebracht werden¹⁶². Diese Sequenz des *GRK5*-Promotors könnte daher eine entscheidende Rolle für die *GRK5*-Expression spielen.

In Hinblick auf die bedeutende Funktion der *GRK5* bei der Pathologie der Herzinsuffizienz sowie bei der Pharmakotherapie mit β -Blockern, kommt dem neu identifizierten Haplotyp ATT möglicherweise eine entscheidende Bedeutung zu.

Die Testung der Hypothesen 3) und 4) konnte die Bedeutung der miR-1, miR-133 und miR-208 für die posttranskriptionelle Genregulation der *GRK2* und *GRK5* sowie weiterer kardial-exprimierter Gene hervorheben. Die Ergebnisse deuten auf eine Regulierung dieser Gene durch die jeweilige miRNA. Diese Identifizierung potentieller Zielgene müsste mittels Co-Transfektion validiert werden.

Hypothese 5) konnte verifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen erstmals eine Korrelation kardial-relevanter miRNAs zu unterschiedlichen Stadien einer ischämisch bedingten Herzerkrankung. Eine niedrige miR-133- und miR-208-Expression ist dabei mit einer herabgesetzten kardialen Leistungskraft assoziiert. Eine Assoziation zur miR-1-Expression besteht nicht. Ferner stehen miRNAs in der Diskussion, als diagnostische und prognostische Marker herangezogen werden zu können. In dieser Arbeit konnten die miR-133 und miR-208 als mögliche Marker für die Risikoabschätzung einer Herzinsuffizienz und deren Prognose identifiziert werden.

7. SUMMARY

Chronic heart failure (CHF) is one of the most common diseases in industrialized countries, mainly caused by coronary artery disease (CAD). The adaption of the circulation system is crucial in the pathogenesis of the disease²⁸⁻³⁰. One of the basic characteristics is the desensitization of G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) notably the β -adrenergic receptor system, which is modulated by G-Protein Coupled Receptor Kinases (GRKs)⁴. Moreover, the β -adrenergic receptor system is a primary target of therapeutic drugs³.

In the heart, the desensitization of β -adrenergic receptors is particularly mediated by GRK2 and GRK5^{5,11,153}. Thus, the regulation of the expression of these enzymes, which is initiated and modulated by the promoter and 3' untranslated region (3' UTR), is of utmost importance. The gene expression is affected by complex regulatory mechanisms involving the enzyme expression via the promoter activity as well as the posttranscriptional regulation of the 3' UTR. The promoter activity can be influenced by regulatory single nucleotide polymorphisms (SNPs).

The posttranscriptional gene regulation is modulated by microRNAs (miRNAs). The impact of particular miRNAs on pathological alterations, especially in the heart, has been a matter of intense research^{79,81,156}. Especially the muscle specific miRNAs miR-1, miR-133 and miR-208 were distinguished. However, their relevance in ischemic heart failure was not yet investigated.

This leads to the following hypotheses, which were tested in this thesis:

- 1) *GRK2* and *GRK5* promoters contain regulatory SNPs that impact on the expression of the GRK enzymes.
- 2) The *GRK2* and *GRK5* promoters are constitutively active and can further be induced by specific stimulation.
- 3) The *GRK5* expression can posttranscriptionally be influenced by regulation of the *GRK5* mRNA. This is carried out by miRNAs, which impact on the mRNA concentration.

- 4) There is a correlation between cardiac expressed miRNAs and GRK2 and GRK5 expression as well as further cardiac expressed genes, which could represent potential target genes.
- 5) The expression of cardiac expressed miRNAs is associated with clinical parameters of heart failure.

Regarding to 1) and 2): The *GRK2* and *GRK5* promoters were sequenced. Three SNPs were identified in the *GRK2* promoter: G(-1138)A (rs10791901) and C(-1095)T (rs11605263), which have already been validated, as well as the SNP A(-43)G that had not been described yet. Upon functional analysis of the SNPs via Luciferase Assay in the HEK293 and A10 cell system and measurement of the promoter activity of the respective constructs, none of the SNPs showed significant differences in the promoter activity.

To characterize the *GRK5* promoter deletion constructs were generated. The sequence region between position -810 and -427 was defined as essential for the overall promoter activity. An In silico analysis allowed the identification of the group of "human and murine ETS1 factors" as possible transcription factors with a putative binding site at position -678 of *GRK5*.

In the *GRK5* promoter, six SNPs were identified: A(-1437)G (rs10787929), C(-1435)T (rs7923896), T(-1091)C (rs1397615), C(-678)T, G(-394)T (rs10886423) and C(-54)T (rs2230347). The SNP C(-678)T has not been described yet and is not registered in the data base. After conducting a haplotype analysis, a linkage disequilibrium of the following SNPs was evident: A(-1437)G, C(-1435)T and C(-678)T resulting in haplotypes ATT (frequency in Caucasians 58,9%), ACC (frequency in Caucasians 40%) and GCC (frequency in Caucasians 1,1%). Stimulation of the haplotype ATT showed the highest promoter activity ($p=0,0083$) in the HEK293 cell system. Moreover, the ATT haplotype showed increased activity following Forskolin ($p=0,005$), Angiotensin II ($p=0,004$) and Interleukin-8 ($p=0,0058$) stimulation in the HEK293 cell system.

Regarding 3) and 4): The expression of *GRK2* and *GRK5* mRNAs as well as additional cardiac-related genes were measured using real-time PCR and associated with the expression of cardiac miRNAs in heart tissue. Significant correlations were

associated for the following gene expressions (Gene:miRNA): GRK2 : miR-133 (p=0,011), GRK5 : miR-208 (p=0,0001), GRK5 : miR-1 (p=0,0001), NPPB : miR-208 (p=0,001), RGS4 : miR-133 (p=0,011), RGS4 : miR-208 (p=0,003), ADRA1 : miR-133 (p=0,024), GNAi2 : miR-1 (p=0,006).

Regarding 5): The expression of miR-1, miR-133 and miR-208 in the heart tissue of CAD patients was correlated with clinical parameters of heart failure.

Analysis relating the miR-1 expression showed no significant associations to clinical parameters of heart failure. In contrast, the miR-133 expression was associated with clinically independent parameters of heart failure: the New York Heart Association (NYHA) classification (p=0,0045), NT-proBNP concentrations (p=0,0131), the Pulmonary Artery Pressure (PAP) (p=0,018) and the Pulmonary Artery Wedge Pressure (PCWP) (p=0,022). A low miR-133 expression, accompanied with progressive symptoms of heart failure, was validated in a RNase protection Assay. MiR-208 expression showed similar findings. Patients with NYHA classification III and IV showed decreased miR-208 expression (p=0,063), as well as patients with high concentrations of NT-proBNP >1800 pg/ml (p=0,053) and increased PCWP (p=0,046). There was no significant correlation to PAP.

In summary, the examination of hypothesis 1) and 2) showed that the identified SNPs in the *GRK2* gene have no impact on the *GRK2* promoter activity. Characterization of the *GRK5* promoter revealed the sequence between position -810 and -427 being essential for promoter activity. In silico analysis identified the group of "human and murine ETS1 factors" as potential transcription factors. This group of transcription factors had already been shown to be related to vascular hypertrophy during hypertension and could thus play an important role in the regulation of the *GRK5* expression¹⁶². Haplotype analysis revealed a linkage disequilibrium between SNPs A(-1437)G, C(-1435)T and C(-678)T resulting in haplotypes ATT, ACC and GCC. Stimulation assays demonstrated haplotype ATT exhibiting the highest promoter activity compared to haplotypes ACC and GCC.

With regard to the remarkable function of GRK5 in the pathology of heart failure and the potential influence of pharmacotherapy with β -blockers, the newly identified haplotype ATT could be of significant relevance.

The examination of hypothesis 3) and 4) emphasized the relevance of miR-1, miR-133 and miR-208 for the posttranscriptional gene regulation of GRK2 and GRK5 and other cardiac related genes (see above). These results indicate the regulation of these genes via the respective miRNA. This identification of potential target genes has to be tested on co-transfection analysis.

Hypothesis 5) could be verified by the respective investigations. The expression of cardially expressed miRNAs correlated with three independent parameters of heart failure, the anamnesticly defined NYHA classification, the laboratory measured NT-proBNP concentration and two haemodynamical parameters (PAP, PCWP). These results show for the first time an expression analysis of cardiac specific miRNAs in ischemic heart disease samples and provide an overview of miRNA expression in different stages of heart failure. The miR-133 and miR-208 expression decreases with progression of heart failure. As miRNAs are being discussed as a prognostic and diagnostic markers in heart disease, miR-133 and miR-208 may be used as potential biomarkers for the risk assessment of heart failure and prognosis.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. *Alberts, B. e. a. Molekularbiologie der Zelle. VCH, Weinheim (2011).*
2. *Lodish, H. e. a. Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (2001).*
3. *Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptors and receptor kinases: from molecular biology to potential therapeutic applications. Nat. Biotechnol. 14, 283-286 (1996).*
4. *Pitcher, J. A., Freedman, N. J. & Lefkowitz, R. J. G protein-coupled receptor kinases. Annu. Rev. Biochem. 67, 653-692 (1998).*
5. *Kohout, T. A. & Lefkowitz, R. J. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. Mol. Pharmacol. 63, 9-18 (2003).*
6. *Reiter, E. & Lefkowitz, R. J. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. Trends Endocrinol. Metab 17, 159-165 (2006).*
7. *Löscher & Frey, H. H. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke, Stuttgart (2010).*
8. *Samama, P., Cotecchia, S., Costa, T. & Lefkowitz, R. J. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. J. Biol. Chem. 268, 4625-4636 (1993).*
9. *Ribas, C. et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. Biochim. Biophys. Acta 1768, 913-922 (2007).*

10. Dzimir, N., Muiya, P., Andres, E. & Al-Halees, Z. Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases. *Eur. J. Pharmacol.* **489**, 167-177 (2004).
11. Benovic, J. L., Strasser, R. H., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 2797-2801 (1986).
12. Strasser, R. H., Sibley, D. R. & Lefkowitz, R. J. A novel catecholamine-activated adenosine cyclic 3',5'-phosphate independent pathway for beta-adrenergic receptor phosphorylation in wild-type and mutant S49 lymphoma cells: mechanism of homologous desensitization of adenylate cyclase. *Biochemistry* **25**, 1371-1377 (1986).
13. Benovic, J. L., Mayor, F., Jr., Staniszewski, C., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **262**, 9026-9032 (1987).
14. Kim, J. et al. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 1442-1447 (2005).
15. Ren, X. R. et al. Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 1448-1453 (2005).
16. Hildreth, K. L. et al. Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor. *J. Biol. Chem.* **279**, 41775-41782 (2004).

17. Koch, W. J., Inglese, J., Stone, W. C. & Lefkowitz, R. J. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 8256-8260 (1993).
18. Penela, P. et al. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* **69**, 46-56 (2006).
19. Pronin, A. N., Carman, C. V. & Benovic, J. L. Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase-5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation. *J. Biol. Chem.* **273**, 31510-31518 (1998).
20. Thiagarajan, M. M. et al. A predicted amphipathic helix mediates plasma membrane localization of GRK5. *J. Biol. Chem.* **279**, 17989-17995 (2004).
21. Lodowski, D. T., Pitcher, J. A., Capel, W. D., Lefkowitz, R. J. & Tesmer, J. J. Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* **300**, 1256-1262 (2003).
22. Siderovski, D. P., Hessel, A., Chung, S., Mak, T. W. & Tyers, M. A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr. Biol.* **6**, 211-212 (1996).
23. Sallese, M., Mariggio, S., D'Urbano, E., Iacovelli, L. & De, B. A. Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. *Mol. Pharmacol.* **57**, 826-831 (2000).
24. Johnson, L. R., Scott, M. G. & Pitcher, J. A. G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. *Mol. Cell Biol.* **24**, 10169-10179 (2004).
25. Cohn, H. I. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans. *Hypertension* **54**, 71-76 (2009).

26. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 569-582 (2000).
27. Weil, J. & Schunkert, H. [Pathophysiology of chronic heart failure]. *Clin. Res. Cardiol.* **95 Suppl 4**, 1-15 (2006).
28. Floras, J. S. *Sympathetic activation in human heart failure: diverse mechanisms, therapeutic opportunities. Acta Physiol Scand.* **177**, 391-398 (2003).
29. Watson, A. M., Hood, S. G. & May, C. N. *Mechanisms of sympathetic activation in heart failure. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **33**, 1269-1274 (2006).
30. Brum, P. C., Rolim, N. P., Bacurau, A. V. & Medeiros, A. *Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. An. Acad. Bras. Cienc.* **78**, 485-503 (2006).
31. Kaye, D. M. et al. *Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. J. Am. Coll. Cardiol.* **26**, 1257-1263 (1995).
32. Du, X. J., Cox, H. S., Dart, A. M. & Esler, M. D. *Sympathetic activation triggers ventricular arrhythmias in rat heart with chronic infarction and failure. Cardiovasc. Res.* **43**, 919-929 (1999).
33. Meredith, I. T., Broughton, A., Jennings, G. L. & Esler, M. D. *Evidence of a selective increase in cardiac sympathetic activity in patients with sustained ventricular arrhythmias. N. Engl. J. Med.* **325**, 618-624 (1991).
34. Van Zwieten, P. A. & de, J. A. *Interaction between the adrenergic and renin-angiotensin-aldosterone-systems. Postgrad. Med. J.* **62 Suppl 1**, 23-27 (1986).

35. Engelhardt, S., Hein, L., Wiesmann, F. & Lohse, M. J. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 7059-7064 (1999).
36. Mann, D. L., Kent, R. L., Parsons, B. & Cooper, G. Adrenergic effects on the biology of the adult mammalian cardiocyte. *Circulation* **85**, 790-804 (1992).
37. Lympieropoulos, A., Rengo, G., Funakoshi, H., Eckhart, A. D. & Koch, W. J. Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat. Med.* **13**, 315-323 (2007).
38. Rockman, H. A. et al. Receptor-specific in vivo desensitization by the G protein-coupled receptor kinase-5 in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 9954-9959 (1996).
39. Yi, X. P. et al. Myocardial expression and redistribution of GRKs in hypertensive hypertrophy and failure. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **282**, 13-23 (2005).
40. Raake, P. W. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ. Res.* **103**, 413-422 (2008).
41. Hata, J. A. & Koch, W. J. Phosphorylation of G protein-coupled receptors: GPCR kinases in heart disease. *Mol. Interv.* **3**, 264-272 (2003).
42. Anderson, K. M., Eckhart, A. D., Willette, R. N. & Koch, W. J. The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension* **33**, 402-407 (1999).
43. Harris, D. M., Cohn, H. I., Pesant, S. & Eckhart, A. D. GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. *Clin. Sci. (Lond)* **115**, 79-89 (2008).

44. *Griendling, K. K., Murphy, T. J. & Alexander, R. W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. Circulation* **87**, 1816-1828 (1993).
45. *Kunapuli, P., Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. Phospholipid-stimulated autophosphorylation activates the G protein-coupled receptor kinase GRK5. J. Biol. Chem.* **269**, 10209-10212 (1994).
46. *Graw Jochen Genetik. Springer, Berlin* (2006).
47. *Mazumder, B., Seshadri, V. & Fox, P. L. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. Trends Biochem. Sci.* **28**, 91-98 (2003).
48. *Penn, R. B. & Benovic, J. L. Structure of the human gene encoding the beta-adrenergic receptor kinase. J. Biol. Chem.* **269**, 14924-14930 (1994).
49. *Ramos-Ruiz, R., Penela, P., Penn, R. B. & Mayor, F., Jr. Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. Circulation* **101**, 2083-2089 (2000).
50. *Brookes, A. J. The essence of SNPs. Gene* **234**, 177-186 (1999).
51. *Schork, N. J., Fallin, D. & Lanchbury, J. S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. Clin. Genet.* **58**, 250-264 (2000).
52. *Buckland, P. R. The importance and identification of regulatory polymorphisms and their mechanisms of action. Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 17-28 (2006).
53. *Guo, Y. & Jamison, D. C. The distribution of SNPs in human gene regulatory regions. BMC. Genomics* **6**, 140 (2005).
54. *Lewontin, R. C. On measures of gametic disequilibrium. Genetics* **120**, 849-852 (1988).

55. Ceolotto, G. et al. Interplay between miR-155, AT1R A1166C polymorphism, and AT1R expression in young untreated hypertensives. *Am. J. Hypertens.* **24**, 241-246 (2011).
56. Sethupathy, P. et al. Human microRNA-155 on chromosome 21 differentially interacts with its polymorphic target in the AGTR1 3' untranslated region: a mechanism for functional single-nucleotide polymorphisms related to phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 405-413 (2007).
57. Martin, M. M. et al. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microrna-155 binding. *J. Biol. Chem.* **282**, 24262-24269 (2007).
58. Latronico, M. V., Catalucci, D. & Condorelli, G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ. Res.* **101**, 1225-1236 (2007).
59. Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* **18**, 504-511 (2004).
60. Selbach, M. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**, 58-63 (2008).
61. van, R. E. & Olson, E. N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J. Clin. Invest* **117**, 2369-2376 (2007).
62. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294**, 858-862 (2001).
63. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854 (1993).

64. *Marcucci, G. et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 358, 1919-1928 (2008).*
65. *Schepeler, T. et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. Cancer Res. 68, 6416-6424 (2008).*
66. *Ambis, S. et al. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. Cancer Res. 68, 6162-6170 (2008).*
67. *Grimson, A. et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. Mol. Cell 27, 91-105 (2007).*
68. *John, B. et al. Human MicroRNA targets. PLoS. Biol. 2, e363 (2004).*
69. *Zhao, Y. et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. Cell 129, 303-317 (2007).*
70. *Yang, B. et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. Nat. Med. 13, 486-491 (2007).*
71. *Care, A. et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. Nat. Med. 13, 613-618 (2007).*
72. *van, R. E. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. Science 316, 575-579 (2007).*
73. *Wienholds, E. et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. Science 309, 310-311 (2005).*
74. *Mansfield, J. H. et al. MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. Nat. Genet. 36, 1079-1083 (2004).*

75. Liu, N. et al. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 20844-20849 (2007).
76. Wang, D. et al. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* **105**, 851-862 (2001).
77. Zhao, Y., Samal, E. & Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**, 214-220 (2005).
78. Costantini, D. L. et al. The homeodomain transcription factor Irx5 establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell* **123**, 347-358 (2005).
79. Xu, C. et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J. Cell Sci.* **120**, 3045-3052 (2007).
80. Chen, J. F. et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228-233 (2006).
81. van, R. E. et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 18255-18260 (2006).
82. Duisters, R. F. et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ. Res.* **104**, 170-8, 6p (2009).
83. Liu, N. et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* **22**, 3242-3254 (2008).

84. *Sprenkle, A. B., Murray, S. F. & Glembotski, C. C. Involvement of multiple cis elements in basal- and alpha-adrenergic agonist-inducible atrial natriuretic factor transcription. Roles for serum response elements and an SP-1-like element. Circ. Res. 77, 1060-1069 (1995).*
85. *Di, S., V, Zaccagnini, G., Capogrossi, M. C. & Martelli, F. microRNAs as peripheral blood biomarkers of cardiovascular disease. Vascul. Pharmacol. (2011).*
86. *Kuwabara, Y. et al. Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients With Cardiovascular Disease Indicate Myocardial Damage. Circ. Cardiovasc. Genet. 4, 446-454 (2011).*
87. *Classen Innere Medizin. Urban und Fischer Verlag, (2006).*
88. *H.Renz-Polster Basislehrbuch Innere Medizin. Todesursachenstatistik: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Urban und Fischer Verlag, München (2004).*
89. *J.Schulte am Esch Anästhesie und Intensivmedizin. Thieme Verlag, (2010).*
90. *Klaus Hoffmann Anästhesiologisches Notizbuch. Wissenschaftliche Verlagsabteilung, Abbott, (1986).*
91. *Yasue, H. & Yoshimura, M. Natriuretic peptides in the treatment of heart failure. J. Card Fail. 2, S277-S285 (1996).*
92. *Levin, E. R., Gardner, D. G. & Samson, W. K. Natriuretic peptides. N. Engl. J. Med. 339, 321-328 (1998).*
93. *Logeart, D. et al. PredischARGE B-type natriuretic peptide assay for identifying patients at high risk of re-admission after decompensated heart failure. J. Am. Coll. Cardiol. 43, 635-641 (2004).*

-
94. Wu, A. H. et al. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptide assay in patients with heart failure: a multisite study. *Clin. Chem.* **50**, 867-873 (2004).
 95. Maisel, A. B-type natriuretic peptide levels: a potential novel "white count" for congestive heart failure. *J. Card Fail.* **7**, 183-193 (2001).
 96. Christian Müller Diagnostischer Einsatz der natriuretischen Peptide. *Kardiovaskuläre Medizin* 459-464 (2004).
 97. Hunt, S. A. et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* **112**, e154-e235 (2005).
 98. Ikeda, S. et al. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* **31**, 367-373 (2007).
 99. Bonnett, B. N., Egenvall, A., Hedhammar, A. & Olson, P. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Vet. Scand.* **46**, 105-120 (2005).
 100. Haggstrom, J., Duelund, P. H. & Kwart, C. New insights into degenerative mitral valve disease in dogs. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* **34**, 1209-viii (2004).
 101. Haggstrom, J., Hamlin, R. L., Hansson, K. & Kwart, C. Heart rate variability in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles spaniels. *J. Small Anim Pract.* **37**, 69-75 (1996).

102. Buchanan, J. W. *Chronic valvular disease (endocardiosis) in dogs*. *Adv. Vet. Sci. Comp Med.* **21**, 75-106 (1977).
103. Olsen, L. H., Fredholm, M. & Pedersen, H. D. *Epidemiology and inheritance of mitral valve prolapse in Dachshunds*. *J. Vet. Intern. Med.* **13**, 448-456 (1999).
104. Swenson, L., Haggstrom, J., Kwart, C. & Juneja, R. K. *Relationship between parental cardiac status in Cavalier King Charles spaniels and prevalence and severity of chronic valvular disease in offspring*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **208**, 2009-2012 (1996).
105. Baumgartner, C. & Glaus, T. M. [Acquired cardiac diseases in the dog: a retrospective analysis]. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **146**, 423-430 (2004).
106. Tidholm, A., Haggstrom, J., Borgarelli, M. & Tarducci, A. *Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology*. *Vet. J.* **162**, 92-107 (2001).
107. Tidholm, A. & Jonsson, L. *Histologic characterization of canine dilated cardiomyopathy*. *Vet. Pathol.* **42**, 1-8 (2005).
108. Ware, W. A., Lund, D. D., Subieta, A. R. & Schmid, P. G. *Sympathetic activation in dogs with congestive heart failure caused by chronic mitral valve disease and dilated cardiomyopathy*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **197**, 1475-1481 (1990).
109. Brodde, O. E. et al. *Regional distribution of beta-adrenoceptors in the human heart: coexistence of functional beta 1- and beta 2-adrenoceptors in both atria and ventricles in severe congestive cardiomyopathy*. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **8**, 1235-1242 (1986).

110. Bristow, M. R. et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ. Res.* **59**, 297-309 (1986).
111. Larosa, G., Armstrong, P. W., Seeman, P. & Forster, C. Beta adrenoceptor recovery after heart failure in the dog. *Cardiovasc. Res.* **27**, 489-493 (1993).
112. Re, G. et al. Canine dilated cardiomyopathy: lymphocyte and cardiac alpha(1)- and beta-adrenoceptor concentrations in normal and affected great danes. *Vet. J.* **158**, 120-127 (1999).
113. Kiuchi, K. et al. Myocardial beta-adrenergic receptor function during the development of pacing-induced heart failure. *J. Clin. Invest* **91**, 907-914 (1993).
114. Swedberg, K. et al. [Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure: executive summary (update 2005)]. *Rev. Esp. Cardiol.* **58**, 1062-1092 (2005).
115. Bristow, M. R. beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* **101**, 558-569 (2000).
116. Abbott, J. A. Beta-blockade in the management of systolic dysfunction. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* **34**, 1157-1170 (2004).
117. Morita, H. et al. Effects of long-term monotherapy with metoprolol CR/XL on the progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with chronic heart failure. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **16**, 443-449 (2002).
118. Sabbah, H. N. et al. Effects of long-term monotherapy with enalapril, metoprolol, and digoxin on the progression of left ventricular dysfunction and dilation in dogs with reduced ejection fraction. *Circulation* **89**, 2852-2859 (1994).

119. Sabbah, H. N. et al. *Chronic therapy with metoprolol attenuates cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 1698-1705 (2000).
120. Tallaj, J. et al. *Beta1-adrenergic receptor blockade attenuates angiotensin II-mediated catecholamine release into the cardiac interstitium in mitral regurgitation. Circulation* **108**, 225-230 (2003).
121. Hanks, G. H. et al. *Beta1-adrenoceptor blockade mitigates excessive norepinephrine release into cardiac interstitium in mitral regurgitation in dog. Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **291**, H147-H151 (2006).
122. Rush, J. E., Freeman, L. M., Hiler, C. & Brown, D. J. *Use of metoprolol in dogs with acquired cardiac disease. J. Vet. Cardiol.* **4**, 23-28 (2002).
123. Tidholm, A. *Survival in dogs with dilated cardiomyopathy and congestive heart failure treated with digoxin, furosemide and propranolol: A retrospective study of 62 dogs. J. Vet. Cardiol.* **8**, 41-47 (2006).
124. Yu, X. et al. *Ischemic inactivation of G protein-coupled receptor kinase and altered desensitization of canine cardiac beta-adrenergic receptors. Circulation* **102**, 2535-2540 (2000).
125. Artzi, S., Kiezun, A. & Shomron, N. *miRNAMiner: a tool for homologous microRNA gene search. BMC. Bioinformatics.* **9**, 39 (2008).
126. Boggs, R. M., Wright, Z. M., Stickney, M. J., Porter, W. W. & Murphy, K. E. *MicroRNA expression in canine mammary cancer. Mamm. Genome* **19**, 561-569 (2008).
127. Shan, H. et al. *Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. Cardiovasc. Res.* **83**, 465-472 (2009).

128. Reddy, A. M. et al. Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs. *BMC. Genomics* **10**, 65 (2009).
129. Jougasaki, M., Grantham, J. A., Redfield, M. M. & Burnett, J. C., Jr. Regulation of cardiac adrenomedullin in heart failure. *Peptides* **22**, 1841-1850 (2001).
130. Haggstrom, J. et al. Effects of naturally acquired decompensated mitral valve regurgitation on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic peptide concentration in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **58**, 77-82 (1997).
131. Macdonald, K. A., Kittleson, M. D., Munro, C. & Kass, P. Brain natriuretic peptide concentration in dogs with heart disease and congestive heart failure. *J. Vet. Intern. Med.* **17**, 172-177 (2003).
132. Martin, M. W. Treatment of congestive heart failure a neuroendocrine disorder. *J. Small Anim Pract.* **44**, 154-160 (2003).
133. Sisson, D. D. Neuroendocrine evaluation of cardiac disease. *Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract.* **34**, 1105-1126 (2004).
134. Asano, K., Masuda, K., Okumura, M., Kadosawa, T. & Fujinaga, T. Plasma atrial and brain natriuretic peptide levels in dogs with congestive heart failure. *J. Vet. Med. Sci.* **61**, 523-529 (1999).
135. Haggstrom, J., Hansson, K., Karlberg, B. E., Kwart, C. & Olsson, K. Plasma concentration of atrial natriuretic peptide in relation to severity of mitral regurgitation in Cavalier King Charles Spaniels. *Am. J. Vet. Res.* **55**, 698-703 (1994).
136. DeFrancesco, T. C. et al. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. *J. Vet. Intern. Med.* **21**, 243-250 (2007).

137. Prosek, R., Sisson, D. D., Oyama, M. A. & Solter, P. F. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. *J. Vet. Intern. Med.* **21**, 238-242 (2007).
138. Haggstrom, J. et al. Relationship between different natriuretic peptides and severity of naturally acquired mitral regurgitation in dogs with chronic myxomatous valve disease. *J. Vet. Cardiol.* **2**, 7-16 (2000).
139. Oyama, M. A., Sisson, D. D. & Solter, P. F. Prospective screening for occult cardiomyopathy in dogs by measurement of plasma atrial natriuretic peptide, B-type natriuretic peptide, and cardiac troponin-I concentrations. *Am. J. Vet. Res.* **68**, 42-47 (2007).
140. Morais, H. A. *Pathophysiology of Heart Failure. Textbook of Veterinary Internal Medicine.* Elsevier Saunders, (2005).
141. Siffert, W. et al. Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1921-1930 (1999).
142. Kimes, B. W. & Brandt, B. L. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp. Cell Res.* **98**, 349-366 (1976).
143. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977).
144. Sambrook, J. & R. D. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press., New York (2000).
145. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).

146. Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**, 357-362 (1995).
147. Vandesompele, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
148. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294**, 853-858 (2001).
149. Noonberg, S. B., Scott, G. K. & Benz, C. C. Evidence of post-transcriptional regulation of U6 small nuclear RNA. *J. Biol. Chem.* **271**, 10477-10481 (1996).
150. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
151. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
152. Buratowski, S. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* **77**, 1-3 (1994).
153. Ishizaka, N. et al. G protein-coupled receptor kinase 5 in cultured vascular smooth muscle cells and rat aorta. Regulation by angiotensin II and hypertension. *J. Biol. Chem.* **272**, 32482-32488 (1997).
154. Arraes, S. M. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK-Expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* **108**, 2906-2913 (2006).

155. Rau, T. et al. Overexpression of wild-type Galpha(i)-2 suppresses beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J.* **17**, 523-525 (2003).
156. Berman, D. M., Wilkie, T. M. & Gilman, A. G. GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. *Cell* **86**, 445-452 (1996).
157. Zhang, S. et al. RGS3 and RGS4 are GTPase activating proteins in the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 269-276 (1998).
158. Mittmann, C. et al. Expression of ten RGS proteins in human myocardium: functional characterization of an upregulation of RGS4 in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **55**, 778-786 (2002).
159. Cheng, Y. et al. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am. J. Pathol.* **170**, 1831-1840 (2007).
160. Liu, S. K., Tilley, L. P., Tappe, J. P. & Fox, P. R. Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **189**, 227-232 (1986).
161. Detweiler, D. K. Spontaneous and induced arterial disease in the dog: pathology and pathogenesis. *Toxicol. Pathol.* **17**, 94-108 (1989).

9. ANHANG

9.1.

Primer

Primer zur Untersuchung des GRK2 Gens auf SNPs:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	T _m (°C)
GRK_Se1	TTGAGATAGGAATGCTGCCTTGAG	24	65
GRK_AS1	GCCATACCCAGACTGCGACT	22	65
GRK_Se2	GTCAGAATCAAGTTGGGGTCA	22	65
GRK_AS2	CGAACCAGACCTGCGACCG	19	65
GRK_Se3	GGTCGCAGGTCTGGTTCGG	19	62
GRK_AS3	CGGCGTGGCCTTGCTCTTC	19	62
GRK_Se4	TGCAGCGGGTGCCCAAGAT	19	65
GRK_AS4	CCCAGCATCAGCGAGACCTCA	21	65
GRK_Se5	TGTCACTGGCTGCCTCCACTCC	22	68
GRK_AS5	ACCCACTGCCTCACCCACC	20	68
GRK_cDNA_Se1e	TGCTCGCATCCCTTCTCG	18	58
GRK_cDNA_AS1e	AAGCGGTTGTGCATGTGCT	19	58
GRK_cDNA_Se2	CTGGAGCACATGCACAACC	19	61
GRK_cDNA_AS2	GCCACGGGAAATCACAATAA	20	61

Primer zur Untersuchung des GRK5 Gens auf SNPs:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	T _m (°C)
GRK5_Se1	CCAGAGTCGGCTTCTGAACGGAT	23	60
GRK5_AS1	ACAGTCGGCGGTACGAACG	20	60
GRK5_AS1b	ACAGCCCGCTTCTCTCCG	17	61
GRK5_3UTR_Se1	AGCAGCTAGTTTCGG	15	45
GRK5_3UTR_AS1	GAGATAGATGTGGGTAAA	18	45

Primer zur Genotypisierung mittels Pyrosequenzierung, GRK2:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
GRK2_G(-1,138)A_Se	TTGATCCTGAGTGGGCCTTC	20
GRK2_G(-1,138)A_AS_BT	GGACCCAGAATCCTTAGTAGGTCA	24
GRK2_G(-1,138)A_Seq	AGGAGGGGTGGGATC	15
GRK2_G(- 43)A_Se	GTCGCAGGTCTGGTTCGG	15
GRK2_G(- 43)A_AS_BT	GGCGTGGCCTTGCTCTTC	15
GRK2_G(- 43)A_Seq	CGAGCGAGCAGGAGC	15
GRK2_A(+19,410)G_Se	GAAAAGCCTCTGTGCTACTGG	21
GRK2_A(+19,410)G_AS_BT	AGGTGCCTTGCTGTGGTC	18
GRK2_A(+19,410)G_Seq	TGTCCCCTCTTGCCC	15

Primer zur Genotypisierung mittels Pyrosequenzierung, GRK5:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
GRK5_A/T(-1,437/5)G/C_Se	TGTAGGACTCGTGGCAGATC	22
GRK5_A/T(-1,437/5)G/C_AS-BT	CTGTGCTCAGCCCCGTTTC	19
GRK5_A/T(-1,437/5)G/C_seq	GGCAGATCCCGGGTG	15
GRK5_C(- 678)T_Se	AGCCCTCCCACTCCGAGCA	19
GRK5_C(- 678)T_AS-BT	CAAGCCGAAGTCCCCAGCAC	20
GRK5_C(- 678)T_seq	GTCACCGGGGCCGT	15
GRK5_T(-1,091) C_Se	GATTTGCTGGCCGGGTGT	18
GRK5_T(-1,091) C_AS-BT	GCACTTTGTTTCCTCGGAGGG	21
GRK5_T(-1,091) C_seq	CTTCCCACGCTGGAC	15
GRK5_G(- 394)T_Se-BT	AGGACTCCAGCTCCCAGCAG	20
GRK5_G(- 394)T_AS	CGGGGGTGTGGTACTAGCAG	20
GRK5_G(- 394)T_seq	GTGGTACTAGCAGGCTC	17

Primer zur Genotypisierung mittels Restriktion, GRK2:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	T _m (°C)
GRK_Se1	TTGAGATAGGAATGCTGCCTTGAG	24	65
GRK_AS1	GCCATACCCAGACTGCGACT	22	65

Primer zur Genotypisierung mittels Restriktion, GRK5:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	T _m (°C)
GRK5_Se1	CCAGAGTCGGCTTCTGAACGGAT	23	60
GRK5_AS1	ACAGTCGGCGGTACAGCAACG	20	60

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	T _m (°C)
GRK5_Leu41_Se	CCACCTGGGAGGAAGA	16	61
GRK5_Leu41_AS	GCGGCTCACCCATTT	15	61

Primer zur Klonierung GRK2:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	
GRK_Se1	TTGAGATAGGAATGCTGCCT	24	} G(-1,138)A/C(-1,095)T
GRK_AS1	GCCATACCCAGACTGCGACA	22	
GRK_Se3	GGTCGCAGGTCTGGTTCGG	19	} G(-43)A
GRK_AS3	CGGCGTGGCCTTGCTCTTC	19	
GRK_Se4	TGCAGCGGGTGCCCAAGAT	19	} A(+19,410)G
GRK_AS5	ACCCACTGCCTCACCCACC	20	

Primer zur Klonierung GRK5:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	T _m (°C)
GRK5_Se1	CCAGAGTCGGCTTCTGAACGGAT	23	60
GRK5_AS1	ACAGTCGGCGGTACAGCAACG	20	60

Primer zur Richtungskontrolle der Inserts:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
SP6 (pGEMT easy)	ATTTAGGTGACACTATAGAA	20
T7 (pGEMT easy)	TAATACGACTCACTATAGGG	20
pMIR_forward (pMIR Report luciferase)	AGGCGATTAAGTTGGGTA	18
GRK_AS5 (pMIR Report luciferase)	ACCCACTGCCTCACCCACC	20

pGI 4.10_forward (pGI 4.10)	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC	20
GRK_AS1 (pGI 4.10)	GCCATACCCAGACTGCGACA	20
GRK_AS3 (pGI 4.10)	CGGCGTGGCCTTGCTCTTC	19
GRK5_AS1 (pGI 4.10)	ACAGTCGGCGGTGAGCAACG	20

Primer zur Untersuchung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an *GRK2*:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
G(-1,138)A_A_Se	GGGTGGGATCAGGGATGGGGGAAGCCTGT	29
G(-1,138)A_A_AS	ACAGGCTTCCCCATCCCTGATCCCACCC	29
G(-1,138)A_G_Se	AGGGGTGGGATCGGGATGGGGGAAGCCTG	30
G(-1,138)A_G_AS	CAGGCTTCCCCATCCCCGATCCCACCCCT	30
C(-1,095)T_C_Se	AGTTGTCAGGTCCCAGGTTC GGGTGACCT	30
C(-1,095)T_C_AS	AGGTCACCCAGAACCTGGGACCTGACAACT	30
C(-1,095)T_T_Se	GCAGTTGTCAGGTCTTAGGTTCTGGGTGACC	31
C(-1,095)T_T_AS	GGTCACCCAGAACCTAGGACCTGACAACTGC	31
G(- 43)A_G_Se	AGCGAGCAGGAGCGGGCGGGCGGGCGGGC	31
G(- 43)A_G_AS	GCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTCTGCTCGCT	31
G(- 43)A_A_Se	GCGAGCAGGAGCGGCGAGCGGGCGGGC GGC	30
G(- 43)A_A_AS	GCCGCCGCCGCCGCTGCCGCTCTGCTCGC	30
A(+19,410)G_A_Se	TGTCCCTCTTGCCCAACCCAGCACCC	30
A(+19,410)G_A_AS	GGGTGCTGGGGTTGGGGCAAGAGGGGACA	30
A(+19,410)G_G_Se	GCTGTCCCTCTTGCCCAAGCCAGCA	29
A(+19,410)G_G_AS	TGCTGGGGCTGGGGCAAGAGGGGACAGC	29

Primer zur Untersuchung der Bindung von Transkriptionsfaktoren an *GRK5*:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)
C(-1,435)T_C_Se	TGGCAGATCCCGGGTGA <u>CC</u> GAAGACAGCCC	30
C(-1,435)T_C_AS	GGGCTGTCTTCGGTCACCCGGGATCTGCCA	30
C(-1,435)T_T_Se	CGTGGCAGATCCCGGGTGA <u>CT</u> GAAGACA	28
C(-1,435)T_T_AS	TGTCTTCAAGTACCCGGGATCTGCCACG	28
A/T(-1,437/5)G/C_A/T_Se	TGGCAGATCCCGGGTGA <u>CT</u> GAAGACAGCCC	30
A/T(-1,437/5)G/C_A/T_AS	GGGCTGTCTTCAAGTACCCGGGATCTGCCA	30
A/T(-1,437/5)G/C_G/C_Se	CGTGGCAGATCCCGGGTGA <u>CC</u> GAAGACA	28
A/T(-1,437/5)G/C_G/C_AS	TGTCTTCGGCCACCCGGGATCTGCCACG	28
C(-678)T_C_Se	GCCCGTGCACCTCCGCTTCCGGGCTGGCGA	30
C(-678)T_C_AS	TCGCCAGCCCGAAAGCGGAGTGCACGGGC	30
C(-678)T_T_Se	CCCGTGCACCTCCGTTTTCCGGGCTGGCG	28
C(-678)T_T_AS	CGCCAGCCCGAAACGGAGTGCACGGG	28

Primer zur Mutagenese von *GRK5*-Promotorkonstrukten:

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'-Richtung	Länge (-mer)	T _m (°C)	GC%
GRK5_Muta1_Se	CCGGGGCCCGTGCACTCCGTTTTC	25	82,9	76
GRK5_Muta1_AS	GGAAAACGGAGTGCACGGGCCCGG	25	82,9	76
GRK5_Muta2_Se	GGCAGATCCCGGTGGCCGAAGACAGCCATTTC	35	83	60
GRK5_Muta2_AS	GGAAATGGGCTGTCTTCGGCCACCCGGGATCTGCC	35	83	60
GRK5_Muta3_Se	GGCCCGTGCACTCCGCTTTCGGGC	25	83	76
GRK5_Muta3_AS	GCCCGGAAAGCGGAGTGCACGGGCC	25	83	76

7. DANKSAGUNG

„Keine Schuld ist dringender als die, Danke zu sagen“, Marcus Tullius Cicero

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die auf verschiedene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka danke ich für ihr entgegengebrachtes Vertrauen und ihr Engagement bei der Korrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. Winfried Siffert danke ich für die Möglichkeit die Dissertation unter seiner Institutsleitung anzufertigen und für seine Unterstützung bei der Teilnahme an Kongressen und Vortragsreihen.

Mein größter Dank gilt PD Dr. Ulrich Frey für die Bereitstellung des Themas, die jederzeit gute Betreuung, die wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft und die Korrektur dieser Arbeit. Zudem möchte ich mich für sein Vertrauen, sein persönliches Engagement und seine Freundschaft herzlich bedanken.

Iris Manthey möchte ich für die hervorragende technische und menschliche Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation herzlich danken. Zudem danke ich ihr für ihren unermüdlichen Einsatz, ihr stets offenes Ohr für wissenschaftliche und private Fragestellungen und für eine sehr schöne Zeit.

Tobi danke ich für seine unendliche Geduld und Unterstützung während der gesamten Zeit und dafür mein ruhender Pol zwischen allem zu sein.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Jana Pechan für ihre Freundschaft, ihre fachliche Kompetenz in Fragen Grafik-Design und die vielen engagierten Stunden nach 16 Uhr, ohne die alles ganz anders aussähe.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren stets begleitet haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihren vorbehaltlosen Rückhalt und ihre ständige Unterstützung das Studium und die Anfertigung dieser Dissertation erst möglich gemacht haben.

Danke.