

Untersuchung von Mineralocorticoidrezeptor-unabhängigen
Effekten des Aldosterons in Mammalierzellkulturen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Britta Wilzewski

Saarbrücken

2011

Tag des Kolloquiums: 29.11.2011

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm F. Maier

Berichterstatter: Prof. Dr. Rita Bernhardt

Prof. Dr. Petra Bauer

Vorsitz: Prof. Dr. Elmar Heinzle

Akad. Mitarbeiter: Dr. Katrin Kaufmann

	Inhaltsverzeichnis	1
	Abkürzungsverzeichnis	8
	Zusammenfassung	11
	Summary	12
1.	Einleitung	13
<hr/>		
1.1	Aldosteron: Biosynthese, Regulation und klassische Wirkungsweise	13
1.2	Der Mineralocorticoidrezeptor	15
1.3	Die Rolle von Aldosteron bei Herzkrankheiten	16
1.4	Nicht-genomische Effekte von Steroiden	17
1.4.1	Schnelle Effekte des Aldosterons	18
1.5	Nicht-MR vermittelte Effekte von Aldosteron in <i>S. pombe</i>	21
1.5.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> als Untersuchungssystem	21
1.5.2	MR-unabhängige Effekte des Aldosterons in der Spaltheife	22
1.5.3	Durch Aldosteron beeinflusste Proteine Ergebnisse	23
1.5.3.1	Vip 1 und Aktin	23
1.5.3.2	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	24
1.5.3.3	Anorganische Pyrophosphatase	25
1.5.3.4	40 kDa Peptidyl-Propyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase/ FK bindende Proteine	26
1.6	Zielstellung der Arbeit	27
2.	Material & Methoden	29
<hr/>		
2.1	Material	29
2.1.1	Säugerzellen	29
	<i>HCT116 Zellen</i>	29
	<i>HL-1 Zellen</i>	29

	<i>Primäre Fibroblasten</i>	29
	<i>Präparation von Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten aus Rattenherzen</i>	29
2.2.	Methoden	31
2.2.1	Bioinformatische Methoden	31
	<i>Homologiesuche</i>	31
	<i>Primerdesign</i>	31
2.2.2	Zellbiologische Methoden	32
	<i>Kultivierung von Zellen</i>	32
	<i>Kultivierung und Pflege von HL-1 Zellen</i>	32
	<i>Pflege der Zellen</i>	32
	<i>Auftauen von Zellen</i>	33
	<i>Kultivierung und Pflege von Fibroblasten und HCT116 Zellen</i>	33
	<i>Passagieren</i>	34
	<i>Langzeitlagerung</i>	34
	<i>Inkubation von Zellen mit Steroiden</i>	34
2.2.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren	35
	<i>RNA-Präparation</i>	35
	<i>Bestimmung der RNA-Konzentration</i>	36
	<i>cDNA-Synthese</i>	36
	<i>PCR</i>	37
	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	37
	<i>Quantitative real-time PCR</i>	38
	<i>Detektion mit SYBR Green</i>	39
	<i>Schmelzkurven</i>	40

<i>Durchführung der rt-PCR</i>	40
<i>Ausgabe der Daten</i>	41
<i>Normalisierung der Daten</i>	41
<i>Statistische Auswertung</i>	41
2.2.4 Arbeiten mit Protein	42
<i>Proteinpräparation aus Zellkulturen</i>	42
<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	43
<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	43
<i>Blotting</i>	44
<i>Reversible Ponceau S Färbung</i>	44
<i>Immunonachweis</i>	44
3. Ergebnisse	47
3.1 Etablierung der primären Kardiofibroblasten	48
3.2 Etablierung der quantitativen RT-PCR	48
3.2.1 Anforderungen der quantitativen RT-PCR	48
3.2.2 Normalisierung	48
3.2.3 Absolute Quantifizierung	50
3.3 Untersuchungen auf RNA-Ebene (RT-PCR)	51
3.3.1 Expression der Kandidaten in Fibroblasten	51
<i>30 Minuten Inkubationszeit</i>	52
<i>45 Minuten Inkubationszeit</i>	54
<i>60 Minuten Inkubationszeit</i>	56
<i>90 Minuten Inkubationszeit</i>	58
<i>120 Minuten Inkubationszeit</i>	60
<i>150 Minuten Inkubationszeit</i>	62

<i>180 Minuten Inkubationszeit</i>	64
<i>210 Minuten Inkubationszeit</i>	66
<i>240 Minuten Inkubationszeit</i>	68
3.3.2 Expression der Kandidaten in HL-1 Zellen	70
<i>30 Minuten Inkubationszeit</i>	70
<i>45 Minuten Inkubationszeit</i>	72
<i>60 Minuten Inkubationszeit</i>	74
<i>90 Minuten Inkubationszeit</i>	76
<i>120 Minuten Inkubationszeit</i>	78
<i>150 Minuten Inkubationszeit</i>	80
<i>180 Minuten Inkubationszeit</i>	82
<i>210 Minuten Inkubationszeit</i>	84
<i>240 Minuten Inkubationszeit</i>	86
3.3.3 Expression der Kandidaten in HCT116-Zellen	88
<i>30 Minuten Inkubationszeit</i>	88
<i>45 Minuten Inkubationszeit</i>	90
<i>60 Minuten Inkubationszeit</i>	92
<i>90 Minuten Inkubationszeit</i>	94
<i>120 Minuten Inkubationszeit</i>	96
<i>150 Minuten Inkubationszeit</i>	98
<i>180 Minuten Inkubationszeit</i>	100
<i>210 Minuten Inkubationszeit</i>	102
<i>240 Minuten Inkubationszeit</i>	104
3.4. Untersuchungen der Kandidaten auf Proteinebene (Western Blot)	106
3.4.1 Expression der Kandidaten in Fibroblasten	107

3.4.1.1	Expression von GAPDH in Fibroblasten	108
3.4.1.2	Expression von LIS in Fibroblasten	110
3.4.1.3	Expression von Beta-Aktin in Fibroblasten	112
3.4.2	Expression der Kandidaten in HL-1 Zellen	114
3.4.2.1	Expression von GAPDH in HL-1 Zellen	114
3.4.2.2	Expression von LIS in HL-1 Zellen	116
3.4.2.3	Expression von Beta-Aktin in HL-1 Zellen	118
3.4.3	Expression der Kandidaten in HCT116 Zellen	120
3.4.3.1	Expression von GAPDH in HCT116 Zellen	120
3.4.3.2	Expression von LIS in HCT116 Zellen	122
3.4.3.3	Expression von Beta-Aktin in HCT116 Zellen	124
4.	Diskussion	126

4.1.	Allgemeine Anmerkungen zur Aldosteronwirkung und zum Versuchsaufbau	126
4.2.	Die Expression der Kandidaten in den unterschiedlichen Zellsystemen	127
4.2.1	Expressionsunterschiede in Fibroblasten	133
4.2.1.1	GAPDH	133
4.2.1.2	Beta-Aktin	134
4.2.1.3	IPP	135
4.2.1.4	LIS	136
4.2.1.5	FKBP & PPlase	137
4.2.2	Expressionsunterschiede in HL-1 Zellen	139
4.2.2.1	GAPDH	139
4.2.2.2	Beta-Aktin	141

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.2.3	IPP	142
4.2.2.4	LIS	143
4.2.2.5	FKBP & PPlase	144
4.2.3	Expressionsunterschiede in HCT116-Zellen	145
4.2.3.1	GAPDH	145
4.2.3.2	Beta-Aktin	146
4.2.3.3	LIS	148
4.2.3.4	FKBP & PPlase	149
4.3.	Einflüsse auf die Versuchsergebnisse	151
4.3.1	Der Einfluss von Spironolacton	151
4.3.2.	Allgemeine Anmerkungen	153
4.3.2.1	Proteinkonzentrationen in Zellen	153
4.3.2.2	Biologische Varianz in Zellkulturexperimenten	153
4.3.2.3	Zellkulturbedingungen	153
4.3.2.4	Technische Anmerkungen zur RT-PCR	154
4.3.3	Der virtuelle zeitliche Verlauf der Expression in Fibroblasten	155
4.3.3.1	GAPDH	155
4.3.3.2	Beta-Aktin	157
4.3.3.3	FKBP	158
4.3.3.4	PPlase	160
4.4	In welcher Weise können die Kandidaten durch Aldosteron beeinflusst werden?	162
4.4.1	GAPDH & Aldosteron – eine mögliche biologische Verknüpfung	162
4.4.2	Beta- Aktin im Zusammenhang mit Herzerkrankungen	164
4.4.3	Anorganische Pyrophosphatase (IPP) und Arterienverkalkung	165

INHALTSVERZEICHNIS

4.4.4	LIS-1 ist Bestandteil des Dynein-Transportsystems	166
4.4.5	FKBP & PPlase im Multiproteinkomplex des MR	167
4.5	Fazit & Ausblick	169
5.	Literaturverzeichnis	172
6.	Anhang	185
	Veröffentlichungen	201
	Danksagung	202

Verwendete Abkürzungen

[Ca ²⁺] _i	freies intrazelluläres Calcium
11β-HSD	11-β Hydroxysteroiddehydrogenase
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
ACE	Angiotensinkonversionsenzym
ACTH	Adrenocorticotropin
Aldo	Aldosteron
ANOVA	Analyse der Varianz
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FKBP	FK bindendes Protein
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GR	Glucocorticoidrezeptor
IPP	anorganische Pyrophosphatase
LIS	Lissenzephalie 1
LS	Längenstandard
LSD	kleinste Differenz zweier Mittelwerte, die gerade noch statistisch signifikant ist (<i>least significant difference</i>)
MMLV	Moloney- Maus-Leukämie-Virus
MR	Mineralocorticoidrezeptor
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NAD	Nikotinamiddinukleotid
NADH	Nikotinamiddinukleotid (reduzierte Form)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NCS	Neonatales Kälberserum
p	Irrtumswahrscheinlichkeit in statistischen Tests
PAI	Inhibitor des Plasminogenaktivators
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Konzentration
PPase	Peptidyl-Propyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
PPIL-1	<i>Peptidyl-prolyl isomerase-like 1</i> ,
RALES	<i>Randomized Aldactone Evaluation Study</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpl	ribosomales Protein der großen Untereinheit
rps	ribosomales Protein der kleinen Untereinheit
RT-PCR	Echtzeit (<i>real time</i>) PCR
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region

Kennzeichnung der Proben in Experimenten

A	mit Aldosteron inkubiert
C	mit Corticosteron inkubiert
K	Kontrolle, mit Ethanol inkubiert
SK	Spironolactonkontrolle, nach Vorbehandlung mit Spironolacton mit Ethanol inkubiert
SA	Kombinationsprobe, nach Vorbehandlung mit Spironolacton mit Aldosteron inkubiert

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen für Nukleinbasen

A	Adenin	G	Guanin
C	Cytosin	T	Thymin

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Aspartat	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin	S	Ser	Serin
E	Gly	Glutamat	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	V	Val	Valin
H	His	Histidin	W	Trp	Tryptophan
I	Ile	Isoleucin	Y	Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

Aldosteron verursacht Veränderungen im Proteom der Zelle, die über den Mineralocorticoidrezeptor (MR) und unabhängig davon vermittelt sein können. Die aktuellen Erkenntnisse über die Rolle von Aldosteron in der Pathophysiologie von Herzerkrankungen fordern ein besseres Verständnis von der Wirkungsweise im Herzen. Die vorliegende Arbeit untersucht Proteinkandidaten, auf die im Modellsystem Spaltheife ein Einfluss des Aldosterons nachgewiesen wurde, in Säugetierzellen auf RNA-Ebene (RT-PCR) und Proteinebene (Western Blot).

Dabei wurden Inkubationszeiten von 30-240 min abgedeckt.

Auf Proteinebene waren weniger signifikante Daten detektierbar als auf RNA-Ebene, die Daten auf RNA- und Proteinebene korrelierten nur wenig. Über den Inkubationszeitraum zeigten die untersuchten Kandidaten einen großen dynamischen Bereich.

Für alle Kandidaten konnten auf RNA-Ebene Unterschiede im Expressionprofil nach der Inkubation mit Aldosteron gezeigt werden, in allen untersuchten Zelllinien traten Effekte auf. In 85 Fällen gab es statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der mit Aldosteron behandelten Proben. Für 36 dieser Fälle konnte eine Beteiligung des MR postuliert werden, in weiteren 33 war der Effekt durch die Inkubation mit dem MR-Antagonisten Spironolacton nicht zu verändern.

Die mögliche Beziehung der Kandidaten zum Aldosteronmetabolismus, ihre Verknüpfung mit Herzerkrankungen und der dynamische Bereich, über den sich die Daten erstrecken, werden kritisch diskutiert.

Summary

Aldosterone causes changes in the proteomic profile of the cell. These changes can both be mediated via the mineralocorticoid receptor and independently. Currently, there is increasing evidence that aldosterone is involved in the pathophysiology of heart failure, demanding a better understanding of the aldosterone action in the heart. The presented work analyzes different protein candidates that were shown to be regulated by aldosterone in fission yeast. Therefore, different mammalian cells were investigated using different incubation time, ranging from 30 to 240 minutes. The expression of the candidates is analyzed with western blots to detect changes on in the proteomic profile. Additionally, the expression levels of RNA were examined using RT-PCR. The comparison of the data showed less significant changes in proteins than in RNA, the correlation of the data is poor.

Concerning the different incubation times, expression showed a huge dynamic range in RNA as well as in protein.

All of the candidates were validated to be effected by aldosterone in the different cell lines. Statistically significant differences between controls and aldosterone treated cells could be shown in 85 cases in total. 36 of them are postulated to be mediated via the MR, for 33, the treatment with spironolactone did not block the aldosterone effect.

The possible role of the candidates in aldosterone metabolism and heart failure as well as the dynamic range of the data is critically discussed.

1 Einleitung

1.1 Aldosteron: Biosynthese, Regulation und klassische Wirkungsweise

Im adrenalen Cortex werden drei verschiedene Hormonklassen hergestellt: Mineralocorticoide werden vorwiegend in der *Zona glomerulosa* synthetisiert, während Glucocorticoide hauptsächlich in der *Zona reticulata* und Androgene in der *Zona reticularis* generiert werden. In Abb.1.1 ist die Steroidbiosynthese in Einzelschritten mit den zugehörigen Enzymen dargestellt.

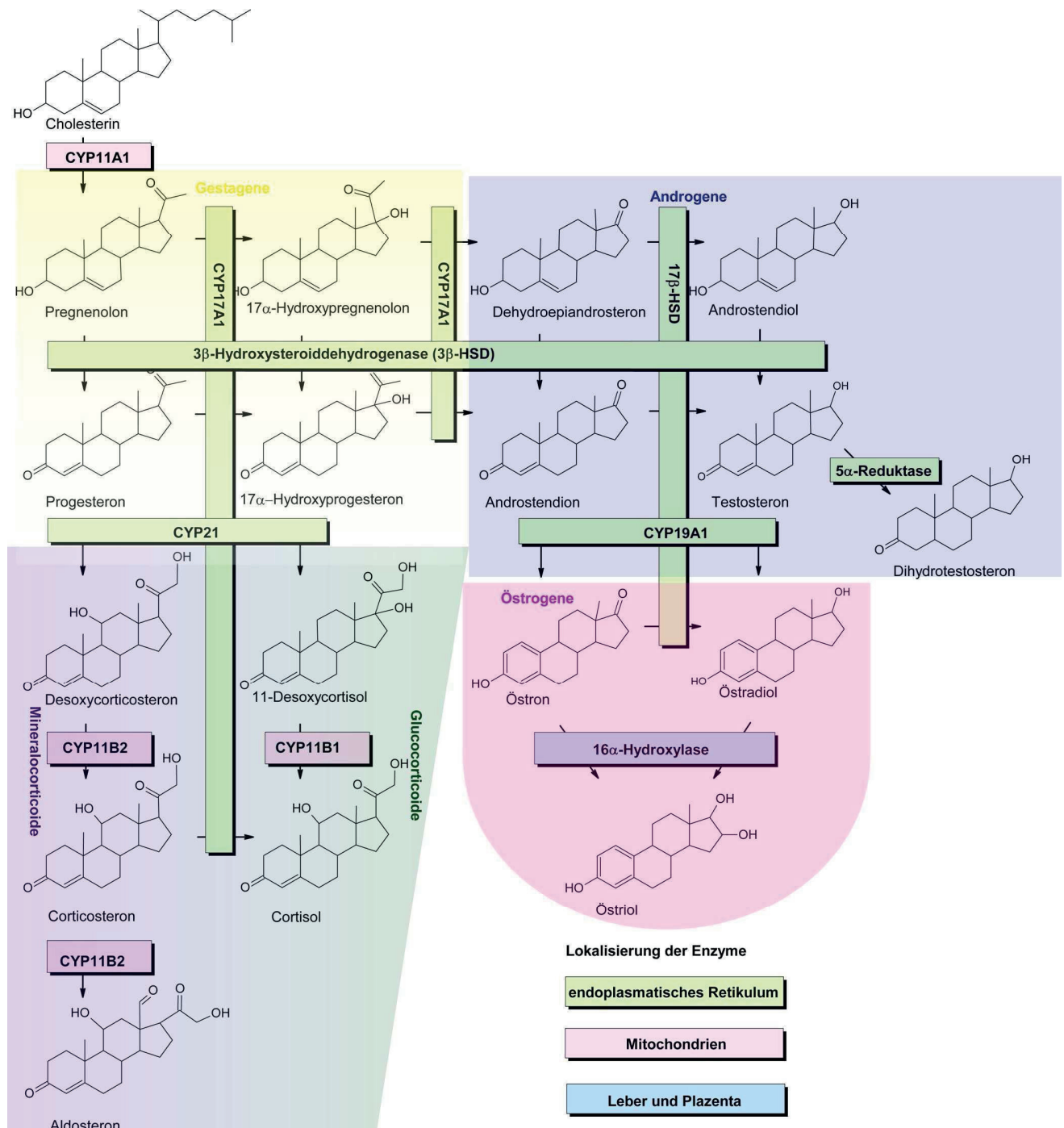


Abb. 1.1 Steroidbiosynthese und beteiligte Enzyme (modifiziert nach (Häggström, 2009; Lisurek und Bernhardt, 2004))

Alle Steroidhormone leiten sich von Cholesterin ab. Der einleitende Schritt ist die Umsetzung von Cholesterin zu Pregnenolon durch die Abspaltung der Seitenkette. Durch Dehydrierung in der 3 β -Position entsteht Progesteron. An dieser Stelle trennen sich die Synthesewege von Glucocorticoiden und Mineralocorticoiden.

Die 21-Hydroxylierung von Progesteron durch CYP21A2 führt zu 11-Desoxycorticosteron. Die folgenden Schritte in der Aldosteronbiosynthese werden durch CYP11B2 (Aldosteronsynthase) katalysiert. Zunächst erfolgt die Hydroxylierung in 11 β -Position zu Corticosteron. Durch Hydroxylierung und Dehydrierung an Position 18 entsteht Aldosteron.

Die Aldosteronsekretion kann über drei verschiedene Wege beeinflusst werden. Eine Übersicht über das Wechselwirken ist in Abb. 1.2 gegeben, die einzelnen Faktoren werden im Folgenden näher beschrieben.

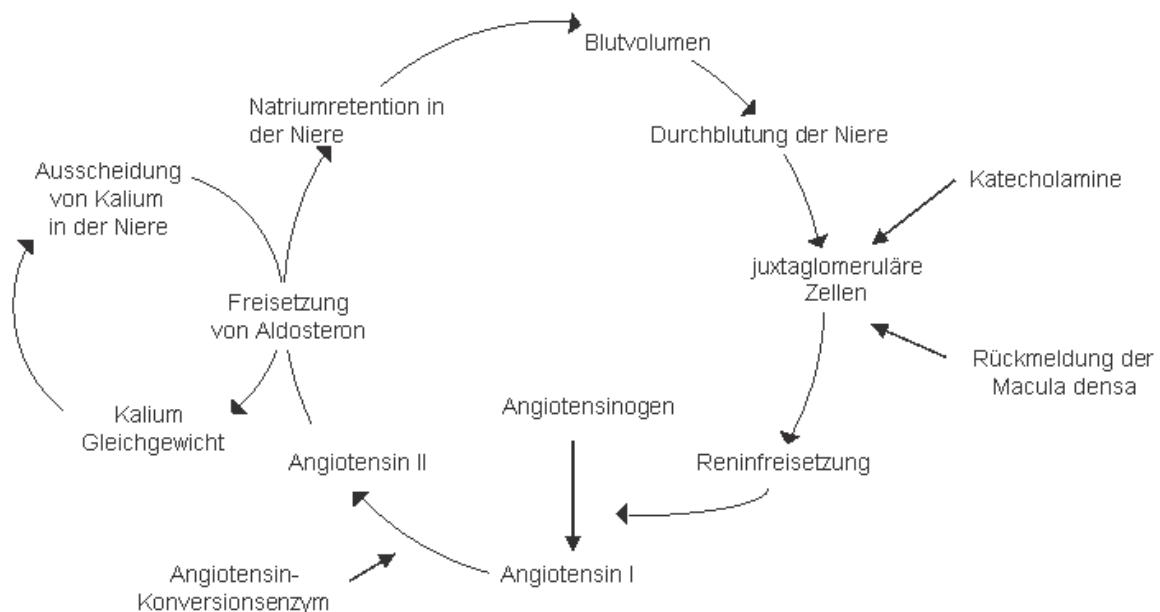


Abb. 1.2 Die wechselseitige Beziehung zwischen Blutvolumen und Kaliumkontrollkreislauf und ihre Effekte auf die Veränderungen der Aldosteronsekretion nach (Williams und Williams, 2003)

Die Wirkungen von Aldosteron auf die Homöostase von Blutvolumen und Natriumgehalt werden über die wechselnde Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems gesteuert. Renin wird in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet und bei schlechter Durchblutung, bzw. niedrigem Natriumgehalt in der Niere ausgeschüttet. Prostaglandine und beta-adrenerge Stimulation fördern die Freisetzung (Davis und Freeman, 1976). Die Zellen der *Macula densa* haben eine Rezeptorfunktion. Über Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter wird die Zusammensetzung des Primärharns sowie die Durchflussrate bestimmt und bei zu niedrigen Werten die Reninfreisetzung angeregt (Hackenthal *et al.*, 1990). Renin wirkt als Aspartylprotease und spaltet Angiotensinogen zu Angiotensin I. Das Angiotensin-

Konversionsenzym (angiotensin converting enzyme, ACE) spaltet Angiotensin I in das aktive Oktapeptid Angiotensin II. Dieses wirkt stark gefäßverengend, hat also eine direkte Blutdrucksteigerung zur Folge. Zusätzlich wird Bradykinin, das gefäßentspannende Wirkung besitzt, durch ACE inaktiviert (Ignarro *et al.*, 1987). Angiotensin II stimuliert die Synthese von Aldosteron, während es eine negative Rückkopplung auf die Reninsynthese hat. Eine Überproduktion von Renin wird somit verhindert. Kaliumionen stimulieren die Aldosteronsynthese direkt, erhöhte Aldosteronwerte fördern die Kaliumausscheidung in der Niere und senken den Kaliumspiegel sehr schnell ab.

Andere Regulatoren der Aldosteronsynthese sind gewöhnlich an Stress gekoppelt, Adrenocorticotropin (ACTH) vermag die Aldosteronsynthese akut stark zu steigern, eine Dauerstimulation mit ACTH zeigt hingegen keinen Einfluss (Whitnall, 1993). Endothelin und Serotonin können die Aldosteronsynthese in schwächerer Form steigern, während Betaendorphine, Dopamine und Digoxin die Aldosteronsynthese hemmen (Williams, 2005). Die Produktion von Aldosteron kann auch außerhalb der Nebenniere erfolgen. Im Hirn von salzsensitiven Ratten ist die Aldosteronsynthese signifikant höher als in Sprague-Dawley Ratten (Gomez-Sanchez *et al.*, 2010). Westcott beschreibt, dass z.B. nach einem Myokardinfarkt die lokale Synthese von Aldosteron in Hirnarealen ansteigt, die mit kardiovaskulärer Regulation in Verbindung gebracht werden (Westcott *et al.*, 2009).

Auch für das Herz ist die Aldosteronproduktion beschrieben. Nachdem zunächst per RT-PCR gezeigt werden konnte, dass die Cytochrome 11B1 und 11B2 im Rattenherz exprimiert werden, konnte an isolierten Rattenherzen die Synthese von Aldosteron und Corticosteron nach Infusion mit Angiotensin II oder ACTH nachgewiesen werden (Silvestre *et al.*, 1999; Silvestre *et al.*, 1998).

1.2 Der Mineralocorticoidrezeptor

Dem traditionellen Verständnis nach erfolgt die Steroidwirkung, indem das Steroid an seinen spezifischen Rezeptor bindet, der gelöst im Cytosol vorliegt. Die Bindung des Steroids aktiviert den Rezeptor, der Steroid-Rezeptor-Komplex wandert in den Zellkern und kontrolliert als Transkriptionsfaktor die Genexpression verschiedener Zielgene.

Der Mineralocorticoidrezeptor (MR) bildet mit dem Glucocorticoidrezeptor sowie den Rezeptoren für Androgene und Progesteron eine gemeinsame Unterfamilie (Estrogenrezeptor-Artige) innerhalb der Superfamilie der nukleären Rezeptoren (Germain *et al.*, 2006). Die funktionale und strukturelle Organisation dieser Rezeptorfamilie ist in drei Domänen unterteilt: eine variable N-terminale Domäne, eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne (90 % Identität) und eine steroidbindende C-terminale Domäne mit 50 % Sequenzidentität (Delcayre und Silvestre, 1999).

Die hohe Identität in der Aminosäuresequenz der steroidbindenden Domäne führt dazu, dass auch Glucocorticoide an den MR binden. Gewöhnlich sind die Plasmakonzentrationen von Glucocorticoiden um drei Größenordnungen höher als die von Aldosteron. Um eine spezifische Bindung von Aldosteron an den MR zu ermöglichen, spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (11 β -HSD 2) überführt Cortisol in Cortison, bzw. Corticosteron in 11 β -Dehydrocorticosteron. Beide Moleküle können den MR kaum aktivieren (Funder *et al.*, 1988). 11 β -HSD 2 wird sowohl in den Nieren als auch im Herzen mit dem MR koexprimiert. Die inaktiven Formen können jedoch den MR immer noch besetzen. Neben Mechanismen der Zelle, die lokale Konzentration der Liganden zu modulieren, können verschiedene Faktoren innerhalb der Zelle die Affinität des Rezeptors zu verschiedenen Liganden beeinflussen. Chaperone, Coregulatoren der Transkription und andere Proteine, die mit dem MR wechselwirken, können an der Vermittlung der Ligandenspezifität beteiligt sein (Gomez-Sanchez, 2010).

Für die selektive Aktivierung des MR durch Cortisol scheint das Verhältnis von NAD zu NADH, das normalerweise ca. 600 beträgt, eine Rolle zu spielen: dieses Verhältnis ist in den Nieren von Bedeutung, wo 11 β -HSD 2 in hohem Maße exprimiert wird. Unter diesen Bedingungen kann der NADH-Gehalt stark steigen (was allerdings keinen oder nur einen geringen Effekt auf den Gehalt von NAD hat), NADH könnte so als intrazelluläres Signal über einen großen dynamischen Bereich dienen.

Bei Blockierung des Enzyms, steigt der Cortisollevel an, aber von einem hohen Grundwert aus. Der NADH Wert dagegen fällt bei Enzymblockade sehr steil ab und könnte Cortisol auf eine bisher noch ungeklärte Weise erlauben, den MR zu aktivieren (Funder, 2005; Funder *et al.*, 1988)

1.3 Die Rolle von Aldosteron bei Herzkrankheiten

Die Bedeutung von Aldosteron für den menschlichen Körper wird deutlich, wenn man betrachtet, welche Krankheitsbilder von Störungen der Aldosteronbiosynthese verursacht werden. Das Conn-Syndrom ist ein Beispiel für den Hyperaldosteronismus, Patienten zeigen als Primärsymptom Bluthochdruck, der häufiger als andere Bluthochdruckformen zu Folgeerkrankungen an beispielsweise Herz, Nieren und Gefäßen führt. Ein großer Teil der Patienten stirbt an koronaren Herzerkrankungen, Herzinfarkt oder Herzinsuffizienz (White, 1994).

Aldosteronmangel hingegen, wie er beispielsweise beim adrenogenitalen Syndrom auftritt, kann zu schweren Störungen des Salzhaushaltes führen. Hyponatriämie und Hypokaliämie, sowie Erbrechen und Gewichtsverlust bei Azidose zeichnen dieses Krankheitsbild, das bis zur lebensgefährlichen Salzverlustkrise führen kann, aus (Nguyen *et al.*, 2008). Ein zu hoher

Aldosteronspiegel verursacht Fibrosen in Herzmuskeln und perivaskulären Zellen (Sun *et al.*, 1997), blockiert die Aufnahme von Noradrenalin im Herzmuskel (Struthers, 1996) und erhöht den Gehalt von PAI-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor). Erhöhte PAI-1 Konzentrationen stellen einen unabhängigen Risikofaktor für Thrombembolien, d.h. den Verschluss von Blutgefäßen durch einen Blutpfropf, dar. In den Herzkranzgefäßen führen solche Embolien zum Herzinfarkt.

Eindrucksvoll belegt wird die Ursache von Aldosteron für schwere Herzerkrankungen, betrachtet man die Ergebnisse von Studien, die die Folgen einer Blockierung des Mineralocorticoidrezeptors durch Aldosteron-Analoga wie Spironolacton oder Eplerenon untersuchen. So konnte in der RALES-Studie gezeigt werden, dass sowohl die Sterblichkeit als auch die Krankhaftigkeit signifikant gesenkt werden, wenn den Patienten neben ihrer bestehenden Therapie (in der Regel Schleifendiuretika, Digitalis und ACE-Hemmer) Spironolacton gegeben wird (Pitt, 2005). In einer nachfolgenden Studie mit mehr als 6000 Patienten wurde die Wirksamkeit von Eplerenon untersucht. Eplerenon zeigt eine geringere Wirkung als Spironolacton, wirkt aber bis zu 100-fach spezifischer auf den Mineralocorticoidrezeptor (Pitt *et al.*, 2001). Durch die geringeren antiandrogenen und progestagenen Eigenschaften kommt es seltener zu Nebenwirkungen wie Gynäkomastie.

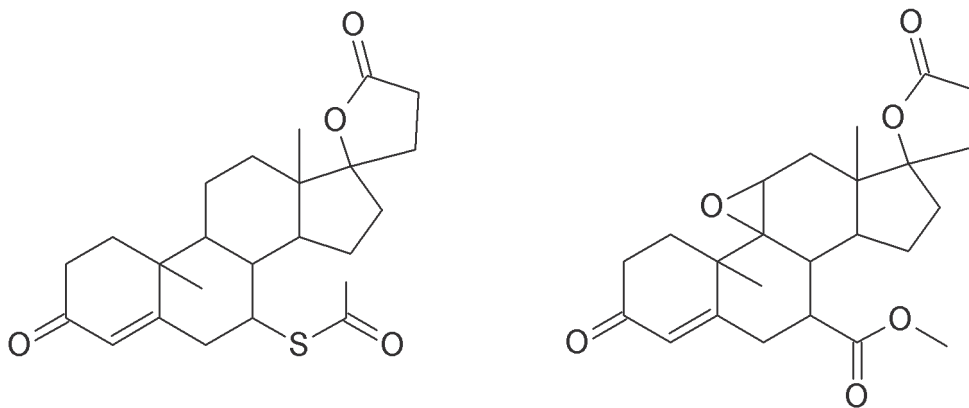


Abb. 1.3 Spironolacton (links) und Eplerenon (rechts) sind Aldosteron-Analoga.

1.4 Nicht-genomische Effekte von Steroiden

Neben der genomischen Wirkungsweise von Steroidhormonen, wie sie in Absatz 1.2 beschrieben wird, sind darüber hinausgehende Effekte seit langem bekannt. 1942 untersuchte Selye die Korrelation zwischen chemischer Struktur und pharmakologischer Wirkung unterschiedlicher Steroide. Neben corticoiden, luteoiden und androgenen Effekten, die bereits bekannt waren und nach mehreren Stunden oder Tagen einsetzten, beschrieb Selye eine bereits nach wenigen Minuten einsetzende Betäubung infolge von Progesteroninjektion in den Bauchraum von Ratten (Selye, 1942).

Weitere Steroideffekte, die zu schnell einsetzten, um über einen genomischen Weg vermittelt worden zu sein, wurden in den 60er Jahren bekannt. Klein und Henk untersuchten den Einfluss von Aldosteron auf Hämodynamik und Blutgerinnung, sie konnten zeigen, dass Aldosteron bei Menschen innerhalb von 5 Minuten zu Gefäßverengung und Blutdrucksteigerung führte, während das Herzminutenvolumen abnahm (Klein und Henk, 1963).

Die Existenz von nicht-genomischen Wirkungsweisen von Steroiden wurde endgültig gesichert, als Spach und Streeten 1964 zeigen konnten, dass sich durch den Einsatz von physiologischen Aldosteronkonzentrationen der Natriumaustausch in isolierten Hundeerythrozyten veränderte, da Erythrozyten von Säugetieren keinen Zellkern besitzen (Spach und Streeten, 1964). In humanen Erythrozyten hat Aldosteron keinen Einfluss auf die Transportsysteme der Erythrozytenmembran, für Reticulozyten konnte jedoch eine signifikante Inhibierung des Na^+ , K^+ , 2Cl^- -Symporters durch Aldosteron nachgewiesen werden (Ivanova *et al.*, 2008).

Die Vielzahl an nicht-genomischen Effekten, die seither bekannt wurden, lässt den Rückschluss zu, dass Steroideffekte in lebenden Zellen eher über verschiedene Signalwege vermittelt werden als nur über einen einheitlichen Mechanismus.

Die eindeutige Zuordnung eines beobachteten Effekts in die Kategorie „nicht-genomisch“ ist nur in den Fällen möglich, wenn der Effekt zu schnell auftritt, um eine genomische Antwort auszulösen oder in kernlosen Zellen beobachtet wurde.

Genprodukte von frühen Genen treten infolge von Stimulation mit Aldosteron nach ca. 1 Stunde auf (Fakitsas *et al.*, 2007). Um eine biologische Funktion zu erfüllen, muss eine gewisse Mindestmenge an Molekülen bereitgestellt werden, so dass ein Effekt, betrachtet man einen kompletten Organismus, eher nach Stunden, mitunter auch erst nach Tagen auftritt.

1.4.1 Schnelle Effekte des Aldosterons

Schnelle Effekte des Aldosterons umfassen Veränderungen des Natriumaustausches (Naray-Fejes-Toth und Fejes-Toth, 2000; Spach und Streeten, 1964) Veränderungen der Konzentration von Kalium- und Natriumionen (Wehling *et al.*, 1987), Zunahme des Zellvolumens (Wehling *et al.*, 1989) und Veränderungen des pH-Wertes (Gekle *et al.*, 1996). Sekundäre Botenstoffe wie cAMP (Christ *et al.*, 1999; Sheader *et al.*, 2002), Lipidkinasen (Phospholipase C (Christ *et al.*, 1995), Phosphoinositid-3-Kinasen (Liu *et al.*, 2003)) und andere Komponenten der Signaltransduktion sind bei der Vermittlung nicht-genomischer Effekte von Aldosteron involviert.

Da die beobachteten nicht-genomischen Effekte durch Inhibitoren des Mineralocorticoidrezeptors nicht unterbunden werden konnten, wurden Rezeptoren postuliert, die über andere Eigenschaften als die klassischen Rezeptoren verfügen und vermutlich membranständig vorliegen sollten (Wehling *et al.*, 1991). Für einige Steroide konnten neue Rezeptoren gefunden werden, es gelang, in Leberzellen von Schweinen, Bindungsstellen mit hoher Affinität für Progesteron aufzureinigen und teilweise zu sequenzieren (Meyer *et al.*, 1996). Im Falle des Aldosterons gelang es, in Membranfraktionen Proteinstrukturen nachzuweisen, die eine spezifische Bindung von Aldosteron aufweisen. Cortisol, und Corticosteron konnten ebenso wenig binden wie Dexamethason, Ouabain, Amilorid oder RU 26988 (Wehling *et al.*, 1992).

Die Reinigung und Identifikation eines solchen Rezeptors steht allerdings noch aus. Bisher ist es nicht gelungen Rezeptoren zu identifizieren, die es erlauben, die Ergebnisse, die aus den Arbeiten mit verschiedenen Zelltypen und Spezies resultieren, übereinstimmend zu erklären.

Vielmehr mehren sich Hinweise darauf, dass klassische Rezeptoren der Steroidwirkung an der Vermittlung nicht-genomischer Effekte beteiligt sein können.

Sicher ist, dass auch ein primär nicht-genomischer Effekt (über einen nicht klassischen Rezeptor) eine genomische Antwort auslösen kann. Eine Übersicht der verschiedenen Wirkmechanismen findet sich in Abb. 1.4.

1. EINLEITUNG

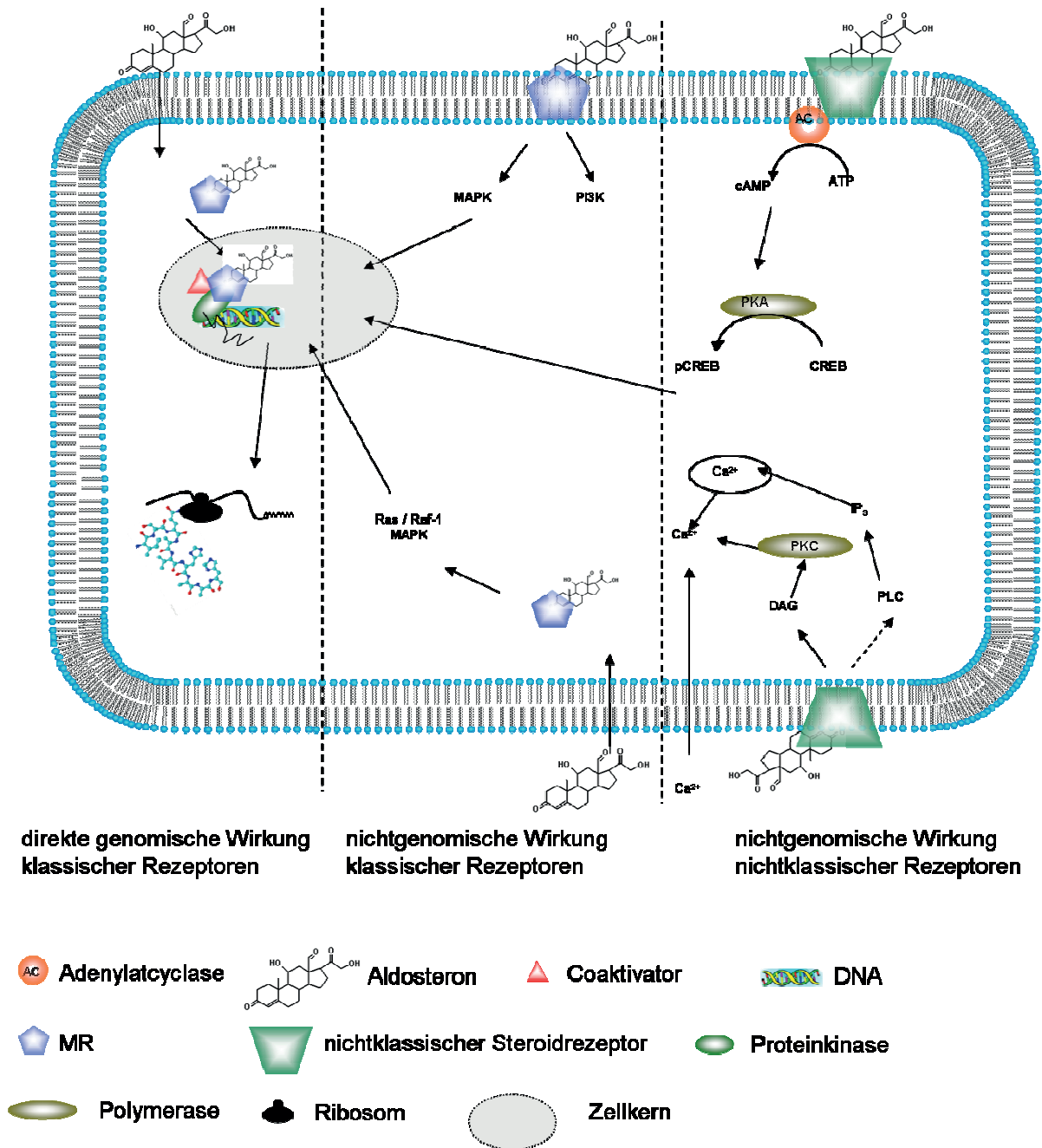


Abb. 1.4 Die Wirkung von Aldosteron kann über den Mineralocorticoidrezeptor, aber auch unabhängig vom MR zu schnellen und zu genomischen Wirkungen führen (modifiziert nach (Lösel und Wehling, 2003)).

1.5. Nicht-MR vermittelte Effekte von Aldosteron in *Schizosaccharomyces pombe*

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit stellen die Ergebnisse einer Doktorarbeit dar (Böhmer, 2005), in der die Effekte von Aldosteron auf das Proteom der Spaltheefe untersucht wurden. Im Folgenden sollen zunächst der Modellorganismus sowie die aus der Arbeit gewonnenen Ergebnisse kurz vorgestellt werden.

1.5.1 *Schizosaccharomyces pombe* als Untersuchungssystem

Schizosaccharomyces pombe ist ein einzelliger Eukaryont, dessen Genom vollständig sequenziert vorliegt (Wood *et al.*, 2002).

Die Spaltheefe besitzt 4824 Gene, von denen über 1800 charakterisiert sind (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/published_genes_progress.shtml). Viele Arbeiten belegen, dass *Schizosaccharomyces pombe* in vielerlei Hinsicht große Ähnlichkeiten mit höheren Eukaryonten aufweist. Untersuchungen zur Kontrolle des Zellzyklus (Fantes, 1977; Gordon und Fantes, 1986), Mitose, Meiose und DNA Reparatur (Davis und Smith, 2001) wurden an diesem Modellorganismus durchgeführt. Einige Regulationsmechanismen sind denen der höheren Säugetiere ähnlich. So weist die Spaltheefe in Bezug auf RNA-Splicing (Remacle *et al.*, 1997) und Hitzeschockantwort mehr Ähnlichkeit mit Säugerzellen auf als die Bäckerhefe (Glick, 1996). Darüber hinaus konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, die bei Menschen mit Krankheiten assoziiert sind, z.B. verschiedene Diabetesformen, angeborene Taubheit, sowie verschiedene Krebsformen (Wood, Gwilliam *et al.*, 2002).

Auch in biotechnologischer Hinsicht ist die Spaltheefe interessant, hier sind z.B. Steroidhydroxylierungen durch Cytochrome P450 zu nennen (Dragan *et al.*, 2005), *Schizosaccharomyces pombe* kann aber auch zur Produktion von Bioethanol (Saithong *et al.*, 2009) oder zur *de novo* Synthese von Vanillin (Hansen *et al.*, 2009) eingesetzt werden.

Die folgenden Eigenschaften machten die Spaltheefe zum geeigneten Modell für die Untersuchung von Aldosteroneffekten auf Proteomebene.

- Hefen sind mit verhältnismäßig geringem Aufwand zu kultivieren, es ist somit möglich, große Proteinmengen in guter Reproduzierbarkeit zu erhalten, um 2D-Gele anzufertigen.
- Die Auflösung von 2D-Gelen liegt bei ca. 1000 Spots pro Gel, Unterschiede auf Proteomebene sind also in einem Organismus mit kleinerem Genom leichter nachzuweisen als beispielsweise in Säugerzellen.
- Die Spaltheefe verfügt über keine nukleären Rezeptoren, Effekte, die vom Aldosteron hervorgerufen werden, können also nicht über den MR vermittelt worden sein.

1.5.2 MR-unabhängige Effekte des Aldosterons in der Spalthefe

Aldosteron zeigte erheblichen Einfluss auf das Proteom der Spalthefe (Details zum Versuchsablauf sind unter (Böhmer, 2005; Böhmer *et al.*, 2006) beschrieben).

Aus insgesamt 38 differentiell regulierten Proteinspots konnten 11 verschiedene Proteine identifiziert werden, die durch Aldosteron signifikant verändert wurden.

Tab. 1.2 Übersicht der durch Aldosteron beeinflussten Proteine in *S. pombe* (Böhmer *et al.*, 2006)

SwissProt Nummer	Proteinname	Genname	spezifisch durch Aldo	Art der Regulation
P21696	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase	gpd1	nein	>2
Q9P3A7	Zellzyklus Protein 48 Homolog	cdc 48	nein *	<0,5
P87216	Vip1	vip1	ja	<0,5
P19117	anorganische Pyrophosphatase	ppa1	ja	<0,5
P40370	Enolase 1-1	eno101	nein	<0,5
Q09864	Hitzeschockprotein 60, mitochondrialer Vorläufer wahrscheinlich Pyridoxin	hsp60	nein	<0,5
O14027	Biosynthese PDX-1 ähnliches Protein	snz1	nein	<0,5
P40375	NAD-abhängiges Malat-Enzym	mae2	nein	<0,5
P78958	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase 1	tdh1	nein	< 0,5
O60101	Phosphoglyceratkinase	pgk1	nein	>2
Q11004	40 kDa Peptidyl-Prolyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase	wis2	ja	>2

Tabelle 1.2 gibt eine Übersicht der Proteine, deren Intensität sich mindestens um den Faktor 2 zwischen den Kontrollen und den Aldosteronproben unterscheidet.

Durch den Vergleich der Spotintensitäten zwischen den Aldosteronproben und den entsprechenden Spots aus den Gelen der mit Corticosteron behandelten Hefen konnten Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob es sich hierbei um spezifische Reaktionen auf das Aldosteron handelt oder ob ein genereller Steroideffekt verantwortlich ist (Böhmer *et al.*, 2006). Folgende durch Aldosteron regulierte Proteine sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.5.3 Durch Aldosteron beeinflusste Proteine

1.5.3.1 Vip 1 und Aktin

Die Behandlung von *Schizosaccharomyces pombe* mit Aldosteron führt zu einer reduzierten Intensität des Proteins auf dem 2D-Gel. Die Inkubation der Zellen mit Corticosteron ruft ebenso eine Intensitätsverringering hervor, die Intensität des vip1 Proteins im Vergleich zwischen den beiden Steroidbehandlungen unterscheidet sich jedoch signifikant. Wird die Nullkontrolle als Referenz verwendet, so ergibt sich für Aldosteron eine um den Faktor 6,9 veränderte Intensität. Die mit Corticosteron behandelten Zellen unterscheiden sich um den Faktor 3,4 von den Nullkontrollen. Aus diesem Grund wird der durch Aldosteron hervorgerufene Effekt als spezifisch eingestuft.

Über vip1 gibt es bisher nur wenige Daten. Es handelt sich um ein 27,5 kDa großes Protein ohne Membrandomänen. Am N-terminalen Ende besitzt vip 1 ein RNA-Erkennungsmotiv. Das Protein konnte nachgewiesen werden, als versucht wurde, p53-Homologe in *Schizosaccharomyces pombe* zu finden. Hierzu wurde polyklonales p53-Antiserum verwendet. Die Immunopräzipitation des vip1 lässt sich durch eine Sequenz im C-terminalen Bereich erklären, die eine 50 %-ige Sequenzhomologie mit einem Bereich des humanen p53 aufweist. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des Proteins deuten auf eine Beteiligung an der Organisation des Cytoskeletts hin. In der zentralen Domäne des Proteins besitzt die Aminosäuresequenz Ähnlichkeit mit dem LIS1 Protein und Proteinen der Myosin-Familie. *In vitro* Versuche zeigten, dass vip1 in der Lage ist, an Tubulin zu binden. Bei *in vivo* Experimenten mit GFP-markiertem vip1 konnte eine Colokalisierung mit den Mikrotubuli während der Zellteilung gezeigt werden (Jungbluth, 2000).

Bioinformatische Analysen im Rahmen des Gene Ontology Projektes ordnen vip1 eine Oxidoreduktasefunktion zu, dem Expressionsmuster nach wird eine Funktion in der Stressantwort der Zelle vermutet (www.geneontology.org/). Wilson-Grady beschreibt fünf verschiedene Phosphorylierungsstellen für vip1 (S132, S177, T230, T232, S235) (Wilson-Grady *et al.*, 2008). Um vip1 weiter charakterisieren zu können, wurde das Protein heterolog

in *E.coli* exprimiert (Lauer *et al.*, 2009). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen aktuell noch aus

In den Proteinspots wurde neben vip1 Aktin identifiziert. Es ist bekannt, dass Aldosteron Fibrosen in verschiedenen Geweben auslösen kann (Lijnen *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 1997). Da bei der Bildung von Fibrosen stets Skleroproteine beteiligt sind, wird Aktin mit in die Untersuchung aufgenommen.

Aktine sind ubiquitäre Strukturproteine, sie sind hochkonserviert und gehören zu den häufigsten Proteinen in Eukaryonten. Aktin-Polymere sind der Hauptbestandteil der Mikrotubuli und so an der Stabilität der Zelle beteiligt. Daneben spielen sie eine entscheidende Rolle in der Zellmotilität und bei dem Aufbau kontraktile Strukturen.

1.5.3.2 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Im Hefemodell konnte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) nur in den Nullkontrollen identifiziert werden. Die Behandlung der Zellen mit Aldosteron und Corticosteron führte zu einer Repression des Proteins jenseits der Nachweisgrenze. Somit ist der Effekt von Aldosteron auf die GAPDH nicht spezifisch, die starke Regulation infolge der Steroidbehandlung jedoch lässt GAPDH zu einem interessanten Kandidaten für die Validierung in Zellkulturen erscheinen.

Die bekannteste Funktion der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase ist die Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat in der Glykolyse und der Gluconeogenese. Es handelt sich um ein konserviertes Enzym, das entsprechend seiner Bedeutung im Proteom überrepräsentiert vorliegt. Aus diesem Grund wurde es lange als Haushaltsgen betrachtet. Darüber hinaus kann GAPDH jedoch eine Reihe von verschiedenen Funktionen in Zellen übernehmen.

Es ist schon lange bekannt, dass Enzyme der Glykolyse an Strukturproteine der Muskeln binden können (Arnold und Pette, 1968). Die Bindung kann an Aktomyosin, Myosin und an Stromaproteine erfolgen, die größte Affinität gibt es jedoch zu F-Aktin.

Streptococcus pyogenes, ein Erreger, der Mandelentzündungen, Scharlach und rheumatisches Fieber hervorrufen kann, exprimiert GAPDH auf der Oberfläche und ist so in der Lage an Lysozym und Fibronectin zu binden (Pancholi und Fischetti, 1992). GAPDH kann darüber hinaus als Peptidase Signalmoleküle des Komplementsystems spalten und so die Phagozytose durch Neutrophile als Immunantwort des Wirtes unterbinden (Terao *et al.*, 2006). In Streptokokken kommt GAPDH also die Rolle eines Multifunktionsproteins zu.

In menschlichen Erythrozyten wird GAPDH durch Bindung an die Zellmembran reversibel inhibiert, möglicherweise erfolgt so die Regulation der Aktivität (Sale *et al.*, 2005).

GAPDH ist in der Lage, mit Nukleinsäuren zu interagieren. Als Monomer kann GAPDH als Uracil-DNA Glycosylase wirken, somit kommt ihr eine Funktion bei der DNA Reparatur zu (Meyersiegler *et al.*, 1991). Darüber hinaus kann GAPDH spezifisch an die 3'-UTR und 5'-UTR Regionen von mRNA binden, was für die Pathogenese viraler Infektionen verantwortlich sein kann (Schultz *et al.*, 1996). In *Bos taurus* kann GAPDH den GABA_A Rezeptor direkt phosphorylieren und verknüpft so die Glykolyse mit neuronaler Hemmung (Laschet *et al.*, 2004).

1.5.3.3 Anorganische Pyrophosphatase

In den 2D-Gelen der Spalthefe ist die Intensität der Proteinspots mit anorganischer Pyrophosphatase in den mit Aldosteron und Corticosteron behandelten Proben gegenüber den Nullkontrollen reduziert. Der Unterschied zwischen Aldosteron und den Nullkontrollen liegt beim Faktor 2,6, der Unterschied zum Corticosteron hingegen beträgt lediglich 1,5. Aus diesem Grund wird die Regulation als spezifisch durch Aldosteron betrachtet.

Anorganische Pyrophosphatasen (*inorganic pyrophosphatase*, IPP) katalysieren die Hydrolyse von Pyrophosphat zu zwei freien Phosphaten. Bisher sind zwei verschiedene Typen von anorganischen Pyrophosphatasen charakterisiert worden, die sich strukturell stark voneinander unterscheiden.

Lösliche Pyrophosphatasen sind ubiquitäre Proteine, die Pyrophosphat unter Wärmefreisetzung hydrolysieren. Daneben sind integrale Membranproteine bekannt, die die Energie, die bei der Hydrolyse des Pyrophosphats entsteht, zum Protonentransport durch Membranen nutzen. Diese H⁺-Pyrophosphatasen konnten bisher in verschiedenen Eubakterien, Archaeen und in den vakuolysosomalen Membranen höherer Pflanzen, sowie einigen Protisten gefunden werden (Perez-Castineira *et al.*, 2002)

Im Stoffwechsel der Zelle fällt Pyrophosphat als Nebenprodukt an. Die Entfernung des Pyrophosphats erlaubt die Verlagerung des Gleichgewichtes von anabolen Reaktionen hin zur Biosynthese (Lahti *et al.*, 1988). Die Synthese von Nukleinsäuren wäre ohne die Kopplung mit der Hydrolyse von Pyrophosphat *in vivo* energetisch nicht möglich (Peller, 1976). Es gibt Hinweise darauf, dass IPP in der Regulation des Zellwachstums und der Synthese von Makromolekülen beteiligt ist (Kent und Guterman, 1982).

1.5.3.4 40 kDa Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase / FK bindende Proteine

Die Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase) ist das einzige Protein, dessen Intensität im 2D-Gel spezifisch infolge der Aldosteronbehandlung zunahm. Im Vergleich zur Nullkontrolle zeigen die Aldosteronproben eine 2,4-fache Intensität des Proteinspots. In den Corticosteronproben ist die PPIase gegenüber den Nullkontrollen 1,8-fach in der Intensität erhöht. Die Intensität des Proteinspots auf den Gelen ist insgesamt schwach, so dass die Steigerung als aldosteronspezifisch angesehen werden kann.

In nativen Proteinen liegen vorwiegend *trans*-Peptidbindungen vor, Prolinreste in Proteinen liegen jedoch zu annähernd 6% in *cis*-Konformation vor (Wang und Etzkorn, 2006). Dabei läuft die Isomerisierung thermodynamisch langsamer ab als die Faltung der Proteine (Eyles und Gierasch, 2000). PPIasen katalysieren die *cis-trans*-Isomerisierung und sind dadurch an vielen biologischen Prozessen beteiligt. Sie werden nach der Homologie ihrer Sequenzen in vier verschiedene Familien eingeteilt. Die in den Spalthafen durch Aldosteron regulierte 40 kDa PPIase gehört zur Familie der Cyclophiline, die an Cyclophilin A binden. Die PPIasen einer anderen Familie binden an FK506 (Tacrolimus) und werden deshalb als FK bindende Proteine (FKBP) bezeichnet. In die Familie der Parvulin-Ähnlichen werden PPIAsen eingeteilt, die Sequenzhomologie zum Parvulin aufweisen. Parvulin ist eine PPIase aus *E. coli*, die im Gegensatz zu Cyclophilinen und FKBP nicht von Immunsuppressiva inhibiert wird. Eine Inhibierung der Parvulin-Ähnlichen kann durch 5-Hydroxy-1,4-naphtho-chinon (Juglon) erfolgen, einem natürlich vorkommenden Farbstoff, der von Walnussbäumen (*Juglans regia*) über die Wurzeln in den Boden abgegeben wird. Die Wurzelbildung anderer Pflanzen wird dadurch unterbunden. Juglon ist isomer zum Farbstoff aus Hennablättern, dem Lawson.

Die vierte Familie der PPIAsen ist spezifisch für Prokaryonten. Sie beinhaltet die Triggerfaktoren, die die Faltung der Proteine am Ribosom unterstützen (Galat, 2003).

Die biologischen Funktionen von PPIAsen sind vielfältig, einige sind direkt an der Proteinfaltung beteiligt, wie z.B. das DmCyP-26, das zur Faltung der Rhodopsin-Isoformen in *Drosophila melanogaster* notwendig ist. Ein orthologes Enzym (hCyP-354) ist beim Menschen für die Umwandlung der Rhodopsin-Isoformen in der Retina verantwortlich (Ferreira *et al.*, 1996).

Ein Cyclophilin ähnliches Protein (*Peptidyl-prolyl isomerase-like 1*, PPIL-1) ist in Colonkarzinomzellen überexprimiert. Zellkulturversuche, in denen die Expression von PPIL-1 mit siRNA unterdrückt wurde, zeigten weniger wachsende Zellen bei gleich bleibender Kolonienzahl. Für PPIL-1 wird deshalb eine Beteiligung an der Kontrolle des Zellzyklus postuliert (Obama *et al.*, 2006).

Pin1 ist eine humane PPIase aus der Familie der Parvulin-Ähnlichen, die spezifisch phosphorylierte Ser/Thr-Pro-Motive isomerisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Pin1 spezifisch mit dem Steroidrezeptor-Coaktivator-3 (SRC-3) interagiert und mit SRC-3 synergistisch die Transkription über nukleäre Rezeptoren aktiviert (Yi *et al.*, 2005).

1.6. Zielstellung der Arbeit

Aldosteron spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und zeigt dabei neben den Wirkungen, die über den Mineralocorticoid Rezeptor (MR) vermittelt werden, auch Effekte, die sich unabhängig vom Rezeptor entfalten (Rossol-Haseroth *et al.*, 2004). Bisher bleiben jedoch viele Aspekte der Aldosteronwirkung, besonders im Bereich der nicht-MR vermittelten Effekte unverstanden.

Es gibt eine Vielzahl von Mechanismen, über die Aldosteron zur Mortalität bei Herzinsuffizienz beitragen könnte. Während man vor allem auf der *in vitro* Ebene schon einige Details (einbezogene Signalkaskaden, sekundäre Messenger) dieser Pathophysiologie erklären kann (Haseroth *et al.*, 1999), sind die genauen Stoffwechselwege, vor allem unter Berücksichtigung der Veränderung des Proteoms, noch nicht verstanden.

Das Ziel der Untersuchung ist es, die folgenden vielversprechenden Kandidaten, die in dem Modellsystem Spaltheife als von Aldosteron beeinflusst identifiziert wurden, in den Mammaliersystemen Mensch, Ratte und Maus zu validieren: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), anorganische Pyrophosphatase (IPP), Lissenzephalie-1-Protein (LIS), Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase). Zusätzlich werden Beta-Aktin (zusammen mit vip in einem Spot gefunden) und das FK bindende Protein (neben der PPIase ein weiterer Vertreter der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen) in die Untersuchung aufgenommen. Die Untersuchung erfolgt hierbei auf zwei Ebenen.

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) werden die Veränderungen der RNA-Synthese detektiert. Dabei werden Aldosteroneffekte, die unabhängig vom MR zu einer genomischen Antwort führen (cross talk), auf der Ebene der Transkription sichtbar. Mit Western Blot Analysen werden Unterschiede auf Proteinebene abgebildet. Mit dieser Untersuchung soll das Verständnis der MR-unabhängigen Aldosteronwirkung vertieft und Proteine, die in Spaltheifen als Kandidaten identifiziert wurden, in Säugerzellen validiert, um so neue potentielle Wirkungswege des Aldosterons aufklären zu können

Diese Kandidaten sollen in Zellkulturen von Mensch, Maus und Ratte validiert werden. Da Herzmaterial von Menschen für umfangreiche Untersuchungen nicht zur Verfügung steht, werden verschiedene Zellkultursysteme verwendet: Die HL-1 Zelllinie wurde aus der atrialen Tumorzelllinie AT-1 (Maus) gewonnen. HL-1 Zellen können passagiert werden und bewahren dennoch ihre differenzierten kardialen morphologischen, biochemischen und

elektrophysiologischen Eigenschaften (Claycomb, Lanson *et al.*, 1998). Sie stellen somit ein geeignetes Kardiomyozytenmodell dar.

Neben Herzmuskelzellen stellen Fibroblasten den häufigsten Zelltypus im Herzen und anderen Organen dar. Aus diesem Grund sollen die Effekte von Aldosteron auf primäre Kardiofibroblasten von Ratten untersucht werden.

Als dritter Zelltyp werden HCT116 Zellen verwendet, es handelt sich hierbei um menschliche epitheliale Zellen, die aus einem Kolonkarzinom stammen.

Beim Wechseln des Systems von der Spalthefe zu Säugerzellen gibt es verschiedene Besonderheiten zu beachten:

- Die unphysiologisch hohen Aldosteronkonzentrationen, die im Hefemodell nötig waren, da die Zellwand die freie Diffusion der Steroide beeinträchtigt (Bureik *et al.*, 2005), werden für die Zellkulturen deutlich reduziert. Hier arbeiten wir mit einer Aldosteronkonzentration von 10 nM. Diese Konzentration liegt noch über den physiologischen Werten, die zwischen 0,04-0,8 nM schwanken, allerdings werden die lokalen Hormonspiegel im Herzgewebe als 20-fach höher als im Plasma eingeschätzt (Silvestre *et al.*, 1998).
- Der Mineralocorticoidrezeptor, über den die Säugerzellen im Gegensatz zur Spalthefe verfügen, stellt jedoch die größte Herausforderung dar. Um die Effekte auf die untersuchten Targets nach Möglichkeit unabhängig vom MR verfolgen zu können, werden zusätzlich Zellen eingesetzt, deren Mineralocorticoidrezeptor durch die Präinkubation mit Spironolacton blockiert wird.

2.1. Material

2.1.1 Säugerzellen

HCT116 Zellen

Die HCT116 Zellen wurden der Arbeitsgruppe ursprünglich von B. Vogelstein, John Hopkins University, Baltimore, zur Verfügung gestellt. Es gibt keine Angaben über die Anzahl der Passagen.

HL-1 Zellen

Die für die Experimente der vorliegenden Arbeit verwendeten HL-1 Zellen wurden aus den Zellen der Passage 45 vermehrt, die freundlicherweise von William C. Claycomb, Health Sciences Center, New Orleans zur Verfügung gestellt wurden. Für die Arbeit wurden Zellen der Passagen 58 bis 60 verwendet.

Primäre Fibroblasten

Als Untersuchungsmaterial dienten neonatale Kardiofibroblasten aus Ratten, diese wurden freundlicherweise von Dr. Heiko Kilter (Arbeitsgruppe Böhm, Myokardiale Signaltransduktion, Universitätsklinikum Homburg) zur Verfügung gestellt. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 3 und 4 verwendet.

Der Vollständigkeit halber soll angegeben werden, wie die Präparation der neonatalen Kardiomyozyten, bei denen die Fibroblasten als Nebenprodukt anfallen, durchgeführt wurde.

*Präparation von Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten aus Rattenherzen **

Im ersten Schritt werden die Herzen von 1-2 Würfen (je 8-12 Tiere) Sprague-Dawley Ratten, die 1-2 Tage alt sind, freigelegt. Dazu wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Der Körper wurde kurz mit 70 % igem Alkohol gespült und der Thorax geöffnet. Das Herz wurde ausgeschnitten und in einer Zellkulturschale mit ADS-Puffer gesammelt. Die Vorhöfe, Blutgefäße und anderes Gewebe wurden entfernt und die Herzen in einer weiteren Schale mit ADS-Puffer gesammelt. Waren alle Herzen präpariert, wurden sie mit einem Cutter in gleichmäßige, möglichst kleine Stücke geschnitten. Der ADS-Puffer wurde abgesaugt und die Gewebestücke in 10 ml ADS Puffer mit 0,06 % Pankreatin und 0,04 % Kollagenase 2 aufgenommen. Die Lösung wurde in einer sterilen Flasche (Ø 5 cm) im Schüttelwasserbad bei 37 °C und 80-100 UpM inkubiert. Nach 5 Minuten wurde der erste Überstand verworfen und durch neue Enzymlösung ersetzt.

* durchgeführt von Frau Julia Michaely

2. MATERIAL & METHODEN

Nach 20 Minuten wurde der Überstand entnommen und in Schraubröhren überführt. Dem Gewebe wurde neuer Verdaupuffer zugesetzt und die Flasche unter den oben genannten Bedingungen geschüttelt. In den Schraubröhren wurde der Verdau durch Zugabe von 2 ml neonatalem Kälberserum gestoppt. Isolierte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 700 UpM für 5 Minuten sanft pelletiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen durch vorsichtiges Schütteln in 4 ml NCS gelöst und bis zum Ende der Präparation mit gelockertem Deckel im Inkubator aufbewahrt.

Insgesamt wurde das Absammeln der aus dem Gewebe gelösten Zellen viermal wiederholt, zweimal nach je 25 Minuten Inkubationszeit, sowie nach weiteren 15 und 10 Minuten.

Die Zellsuspensionen wurden vereint und die Zellen durch Zentrifugation bei 700 UpM für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen durch vorsichtiges Schütteln in 4 ml Medium gelöst. Das Filtrieren durch ein Zellsieb (70 µm) vereinzelt die Zellen, die auf beschichtete Zellkulturschalen (Ø 6 cm) ausgesät und für 90 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. Während dieser Zeit konnten die Fibroblasten adhären. Durch vorsichtiges Aufklopfen wurden die Kardiomyozyten zum Schwimmen gebracht und durch Überführen des Mediums in eine neue Schale von den Fibroblasten getrennt. Nach der Kontrolle unter dem Lichtmikroskop konnte der Vorgang 1-2 mal wiederholt werden, um die Ausbeute an Kardiomyozyten zu verbessern.

Die Fibroblasten enthielten noch einige verbleibende Cardiomyozyten, die allerdings bei der ersten Passage der Zellen verloren gingen, weil die Fibroblasten in unbeschichteten Schalen kultiviert wurden.

ADS-Puffer (pH 7,35)

116 mM NaCl
20 mM HEPES
0,8 mM Na₂HPO₄
5,6 mM Glukose
5,4 mM KCl
0,8 mM MgSO₄

Medium

Ham's F10
10 % Pferdeserum
5 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatische Methoden

Homologiesuche

Als Ausgangspunkt der Homologiesuche dienten folgende, in *Schizosaccharomyces pombe* durch Aldosteron reguliert gefundene Proteine:

P78958 Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase

P19117 anorganische Pyrophosphatase

P87216 vip

P10989 Aktin (zusammen mit vip in einem Spot gefunden)

Q11004 PPlase

Der Homologievergleich fand auf Proteinebene statt, dazu wird die Sequenz des Proteins im FASTA Format in die NCBI-Datenbank eingegeben und nacheinander gegen die Proteindaten von Mensch, Maus und Ratte abgeglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Primerdesign

Im nächsten Schritt wurden die cDNA-Sequenzen und die Exonverteilung der für die genannten Proteine codierenden Gene (<http://www.ensembl.org>) zu Grunde gelegt, um Primer für die qRT-PCR zu entwerfen. Hierzu wurde das Programm Primer3 verwendet (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Es wurden Paare ausgesucht, von denen mindestens ein Primer exon-spannend ist, um die Vermehrung von genomischer DNA ausschließen zu können. Da die quantitative real-time PCR in 96-well-Platten durchgeführt wurde und somit verschiedene Transkripte im gleichen Lauf erzeugt wurden, mussten die Primer möglichst nahe beieinander liegende Schmelzpunkte besitzen. Um die Quantifizierung so zuverlässig wie möglich durchzuführen, war es nötig, dass die erzeugten DNA-Fragmente sich in ihrer Länge so wenig wie möglich unterschieden.

Die Parameter beim Primerdesign wurden also wie folgt gewählt:

Transkriptlänge	150-250 bp
Primerlänge	20 ± 2 Basen
Schmelzpunkt :	60 °C ± 3 °C

Eine Liste aller verwendeten Primer findet sich im Anhang.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung und Vermehrung der Zellen erfolgte für alle Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂, die Medien waren den jeweiligen Bedürfnissen der Zellen angepasst und sind in Tabelle 2.2.1 aufgeführt.

Tab. 2.2.2.1 Medien und Zusätze für die verwendeten Zelllinien

	Primäre Fibroblasten	HCT116	HL-1
Verwendetes Medium	DMEM	McCoys	Claycombs
Eingesetzte Menge an FCS	30 %	10 %	10 %
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM
Norepinephrin			0,1 mM

Kultivierung und Pflege von HL-1 Zellen

Alle Kultivierungsbedingungen für HL-1 Zellen wurden den Anweisungen von William Claycomb entnommen (Claycomb, 1998). Da sich die Bedingungen zum Teil deutlich von herkömmlichen Kultivierungsbedingungen unterschieden, werden sie nachfolgend detailliert beschrieben.

HL-1 Zellen sind nicht adhärent und benötigen daher einen Untergrund, auf dem sie anhaften können. Diese Unterlage wird durch das Beschichten der Zellkulturschale mit Fibronectin/Gelatine erzielt, hierzu wird Fibronectin-Gelatine-Lösung (5 ppm Fibronectin in 0,02 % Gelatine) in die Zellkulturschalen gegeben (2 ml Lösung pro 25 cm² Fläche) und gleichmäßig verteilt. Die Schalen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Beschichtungslösung wird entfernt, unmittelbar bevor die Schalen mit Medium versehen und die Zellen ausgesät werden.

Pflege der Zellen

Das Medium der Zellen wurde täglich ausgetauscht. Haben die Zellen die nötige Dichte zur Subkultivierung erreicht, wurde die Passage wie folgt durchgeführt.

Nach dem Absaugen des Mediums wurde vorsichtig eine auf 37 °C vorgewärmte 0,05 % ige Trypsin/EDTA Lösung (3 ml für 25 cm², bzw. 6 ml für 75 cm²) an den Rand der Zellkulturschale pipettiert und diese vorsichtig geschwenkt. Die Lösung wurde vollständig abgezogen und durch neue Lösung (1,3 ml für 25 cm², bzw. 3 ml für 75 cm²) ausgetauscht. Nach 2-minütiger Inkubation der Schalen bei 37 °C wurde die Lösung noch einmal getauscht und für weitere 2-3 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und ggf. durch leichtes Klopfen der Schale auf die Tischoberfläche unterstützt.

2. MATERIAL & METHODEN

Längere Inkubationszeiten bzw. höhere Trypsinkonzentrationen sind unbedingt zu vermeiden, da die Zellen sonst nicht wieder anwachsen würden.

Der Trypsinverdau wurde durch die Zugabe des gleichen Volumens 0,025 % Trypsininhibitors (aus Sojabohnen) gestoppt, die Zellen wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Ausbeute an Zellen zu verbessern, wurden die Schalen gewaschen. Hierzu wurden 5 ml Waschmedium (Claycombs mit 5 % FCS, ohne Glutamin und Norepinephrin) in die Schalen gegeben und die verbleibenden Zellen darin aufgenommen. Die Zellen wurden in den 15 ml Zentrifugenröhrchen vereint und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen in vorgewärmtes Medium (1ml pro Schale) resuspendiert und auf die Schalen aufgeteilt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach der Zentrifugation in FCS mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in Cryogefäße überführt. Das DMSO dient als Gefrierschutzmittel und verringert die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens und Auftauens. Eiskristalle können die Zellorganellen und somit die Überlebensfähigkeit der Zellen zerstören. Die Röhrchen wurden in einen Einfrierbehälter gegeben und die Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit einer Einfrierrate von 1°C pro Minute eingefroren.

Nach 6–12 Stunden können sie zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff überführt werden.

Auftauen von Zellen

In bereits vorbereitete, mit Fibronectin/Gelatine beschichtete 10 cm Schalen wurden jeweils 10 ml Claycomb Medium vorgelegt und warmgestellt. In 15 ml Schraubröhren wurden je 10 ml vorgewärmtes Waschmedium gegeben und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Das Cryogefäß mit den Zellen taute im Wasserbad schnell auf, direkt im Anschluss wurden die Zellen in das vorgelegte Waschmedium überführt, um das DMSO möglichst schnell aus den Zellen auszuwaschen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 500 g wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in die vorbereiteten Schalen überführt und gleichmäßig verteilt. Nachdem die Zellen auf der Unterlage angewachsen waren, wurde ein Mediumwechsel (erneut gegen 15 ml) durchgeführt, um die Zellen vollständig von DMSO zu befreien.

Kultivierung und Pflege von Fibroblasten und HCT116 Zellen

Ein Mediumwechsel erfolgte nach jeweils 2-3 Tagen. Alle in der Arbeit verwendeten Zellen wuchsen als Einzelzellschicht (monolayer), d.h. die Zellen wachsen in einer Ebene. Zellen aus mehrzelligen Organismen verfügen über die Fähigkeit, die Proliferation einzustellen, wenn der ihnen zugeordnete Platz ausgefüllt ist. Diese Kontaktinhibition findet auch *in vitro* statt, sofern keine Störung des Zellzyklus vorliegt (Holley, 1968). Das Aufteilen der Zellen auf

2. MATERIAL & METHODEN

verschiedene Schalen bei Erreichen einer ausreichenden Zelldichte erfolgte daher in der Regel unter subkonfluenten Bedingungen.

Passagieren

Zum Vereinzeln der Zellen wurde eine milde Trypsinbehandlung durchgeführt, bis die Zellen nicht mehr aneinander haften. Hierzu wurde zunächst das Medium abgezogen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurde eine 0,05 % ige für Fibroblasten, bzw. eine 0,25 % ige Trypsinlösung für HCT116 Zellen zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle der Zellen im Lichtmikroskop gab Aufschluss darüber, ob die Zellen noch aneinander haften. Nach ausreichender Inkubationszeit (5 bis maximal 10 Minuten) wurde der Trypsinverdau durch die Zugabe weniger Tropfen FCS gestoppt. Die Zellen wurden durch Auf- und Abziehen in der Pipette gleichmäßig im Medium verteilt und im gewünschten Teilungsverhältnis auf vorbereitete Schalen mit Medium aufgeteilt.

Langzeitlagerung

Sollten Zellen eingefroren werden, so wurde die Zelldichte bestimmt und jeweils 10^7 - 10^8 Zellen pro Cryovial in Serum mit 5 % DMSO mit einer Einfrierrate von 1°C pro Minute bis auf -80 °C abgekühlt. Nach 6–12 Stunden konnten sie zur Langzeitlagerung in Flüssigstickstoff überführt werden. Zum Auftauen der Zellen wurden die Gefäße im 37 °C Wasserbad schnell aufgetaut und in vorbereitete Schalen mit 15 ml Medium gleichmäßig verteilt. Nachdem die Zellen angewachsen waren (4-6 Stunden), wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um Reste von DMSO und tote Zellen zu entfernen.

Inkubation von Zellen mit Steroiden

Am ersten Tag wurden Zellen dem Versuch entsprechend ausgesät. Für Schalen mit 10 cm Durchmesser wurden 2×10^6 Zellen, bzw. für 6 cm Schalen 7×10^5 Zellen verwendet.

Am nächsten Tag erfolgte die Kontrolle der Zellen unter dem Lichtmikroskop. War die Zelldichte zufriedenstellend, und waren optisch keine Kontaminationen zu erkennen, begann die Inkubation mit Steroiden wie folgt.

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und gegen neues ausgetauscht. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten wurden den Platten Steroide (Aldosteron bzw. Corticosteron) in einer Endkonzentration von 10 nM zugesetzt (dafür 10 µl 10 µM Lösungen zugeben) und die Platten zum Mischen sanft geschwenkt. Den Kontrollen wurden 10 µl Ethanol in HPLC Qualität zugesetzt.

Für Spironolactonproben wurden die Zellen mit Spironolacton präinkubiert (Die Verwendung von 5 µl 20 mM Spironolacton ergab eine Endkonzentration von 10 µM. Die höhere Ausgangskonzentration wurde verwendet, um den Anteil an Alkohol nicht zu hoch werden zu

lassen. Noch höhere Konzentrationen schienen nicht sinnvoll, da Pipettierfehler, bzw. Volumenveränderungen aufgrund von Temperaturschwankungen bei sehr kleinen Volumina stärker zum Tragen kommen). Nach einer Wartezeit von wiederum 30 Minuten wurde Aldosteron bzw. Ethanol zugesetzt.

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (10 ml pro Schale), das PBS wurde im Anschluss abgesaugt. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber geerntet und mit Transferpipetten in Reaktionsgefäße überführt. Die Gefäße wurden in der Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert und der Überstand abgegossen. In flüssigem Stickstoff wurden die Zellen schnell eingefroren und bis zur Präparation von RNA/Protein bei -80 °C gelagert. Für HL-1 Zellen erfolgte die Präparation aufgrund des geringeren Ausgangsmaterials stets mit frischen Zellen.

2.2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

RNA-Präparation

Zur Präparation von RNA wurde das RNA Invisorb Kit verwendet (Invitex, Berlin). Als Ausgangsmaterial dienten konfluente Zellen aus Schalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm (für HL-1 Zellen und Fibroblasten) bzw. 10 cm (für HCT116 Zellen).

Nach dem Abziehen des Mediums wurden die Schalen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden zur Vermeidung von Stress nicht trypsiniert, sondern mit Zellschabern geerntet und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Reste von PBS wurden nach einer kurzen Zentrifugation abgesaugt und die Zellen in 500 μl Lysepuffer aufgenommen. Die Lyse der Zellen erfolgte in der Regel innerhalb von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Wegen der größeren Menge an Ausgangsmaterial wurden bei HCT116 Zellen 10 Minuten Inkubationszeit zur Lyse der Zellen gewählt.

Im nächsten Schritt wurden 30 μl Adsorbin zugesetzt und durch gründliches Vortexen emulgiert. Beim Adsorbin handelt es sich um Trägermaterial, das genomische DNA bindet. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten auf Eis wurde durch eine kurze Zentrifugation das Adsorbin und damit ebenfalls die daran gebundene DNA pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltene RNA mit Phenol-Chloroform extrahiert.

Hierzu wurden pro Gefäß je 500 μl Phenol (wassergesättigt, pH 4,5-5), 100 μl Chloroform und 5 μl Puffer A zugegeben und für 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die organische Phase von der wässrigen Phase in einem Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 14000 UpM voneinander getrennt.

Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Um möglichst reine RNA zu erhalten, durften keine Bestandteile der Interphase überführt werden. Die erhaltene Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versehen und vorsichtig gemischt. Die

2. MATERIAL & METHODEN

Präzipitation der RNA erfolgte bei -20 °C für mindestens 30 Minuten oder wurde über Nacht durchgeführt.

Die ausgefallene RNA wurde durch Zentrifugieren für 10 Minuten bei 14000 UpM pelletiert, der Überstand wurde vorsichtig verworfen.

Phenolreste wurden durch Waschen mit eiskaltem 70 % igen Ethanol (RNase-frei) entfernt. Dazu wurde pro Gefäß 1 ml Ethanol zugesetzt und das Pellet durch wiederholtes Invertieren des geschlossenen Gefäßes gewaschen. Nach Zentrifugation für 3 Minuten bei 14000 UpM wurde der Ethanol vorsichtig verworfen. Der Waschschrift wurde zwei- bis dreimal wiederholt, bis kein Phenolgeruch mehr wahrgenommen wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der verbliebene Alkohol herunter zentrifugiert und vorsichtig abpipettiert. Das RNA Pellet wurde im Thermomixer bei 60 °C getrocknet und in 50 μl DEPC-Wasser (100 μl für RNA aus HCT116 Zellen) aufgenommen.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration der RNA-Präparation erfolgte photometrisch, die Absorption der 50-fach verdünnten Proben wurde bei 260 nm und 280 nm bestimmt, die RNA-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] entspricht dem 40-fachen Wert der Absorption bei 260 nm. Die Verhältnisse der Absorptionen bei 260 und 280 nm geben Aufschluss über die Reinheit der Präparation, dabei entspricht ein Wert von 2,0 einer reinen RNA-Präparation, bzw. 1,8 einer reinen DNA-Präparation.

cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde das MMLV-reverse Transkriptase Kit von Invitrogen verwendet, dabei wurde Gesamt-RNA eingesetzt. Durch die Verwendung von Oligo(dT) Primern wurde sichergestellt, dass keine genomische DNA amplifiziert wurde. Für alle Proben einer Inkubationszeit wurde jeweils die gleiche Menge Gesamt-RNA eingesetzt.

Im ersten Schritt wurden Oligo(dT) Primer, dNTPs und die Ausgangs-RNA auf 65 °C erhitzt, um ein Anlagern der Primer an den PolyA-Schwanz der mRNA zu ermöglichen.

Nach einer schnellen Abkühlung auf Eis wurde die benötigte Menge an konzentriertem Puffer zugesetzt. Zusätzlich wurden ein RNase-Inhibitor (RNase out) und DTT eingesetzt und die Proben bei 37 °C inkubiert, um eine schnelle Inhibierung der RNasen zu erreichen.

Als letzter Schritt erfolgte die Zugabe von reverser Transkriptase zur Synthese des cDNA Strangs, die ebenfalls bei 37 °C erfolgte. Nach einer Hitzeinaktivierung bei 70 °C konnte die erhaltene RNA direkt als Matrize in der real-time PCR eingesetzt werden.

PCR

Alle Primer wurden auf ihre Funktionalität getestet. Aus unbehandelten Zellen wurde wie oben beschrieben RNA isoliert und daran cDNA synthetisiert, die als Matrize in der folgenden PCR diente. Die PCR-Ansätze wurden mit einem Volumen von jeweils 20 µl angesetzt.

PCR-Ansatz

- 50 mM TrisCl, pH 9,1
- 16 mM (NH₄)₂SO₄
- 3,5 mM MgCl₂
- 0,15 % BSA
- 0,25 mM dNTPs
- 0,05 U/µl TaqPolymerase*
- je 0,2 µM Vor- und Rückprimer
- 1 µl cDNA

* es handelt sich hierbei um Klentaq Units, 1 U Klentaq = 4 U DNA Taq Polymerase

Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte entsprachen den Bedingungen der real-time PCR, aus Kostengründen wurde jedoch darauf verzichtet, die Vervielfältigung der Produkte in Echtzeit zu verfolgen. Es wurde ein handelsüblicher Thermocycler verwendet. Zum Nachweis der Produkte mithilfe von Ethidiumbromid im Agarosegel wurde mehr Ausgangsmaterial benötigt, daher wurde die Anzahl der Zyklen auf 60 erhöht.

Tab. 2.2.3.1 PCR-Bedingungen für den Funktionstest der Primer

Phase	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Anzahl der Wiederholungen
Aktivierung	Denaturierung	95	600	Einzelschritt
Amplifizierung	Denaturierung	95	30	60
	Anlagern der Primer	51	60	
	Synthese	72	30	
Schmelzen	Denaturierung	95	60	Einzelschritt

Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente in Richtung der Anode. Das Agarosegel stellt eine elektrisch neutrale Matrix dar, deren

2. MATERIAL & METHODEN

Porengröße vom Agarosegehalt bestimmt wird. Die Wahl der Agarosekonzentration ist abhängig von der Größe der zu trennenden Fragmente.

In der vorliegenden Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2 % verwendet. Zum Anfärben der Nukleinsäuren wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml in die noch warme Agaroselösung gegeben, die dann in die vorbereiteten Gelschritten gegossen und mit Kämmen versehen wurde. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Schlitten mit dem Gel in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (0,5 x TBE/ TAE) gelegt und der Kamm entfernt. Die PCR-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Volumen Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zum Größenvergleich wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese der DNA erfolgte bei 100 V bis zur vollständigen Auftrennung. Der DNA-Ethidiumbromid-Komplex wird nach Anregung durch UV-Licht sichtbar gemacht und die Gele mithilfe eines Kamerasystems visualisiert.

Auftragspuffer

10 mM TrisCl, pH 7,6
60 mM EDTA
0,03 % Bromphenolblau
0,03 % Xylencyanol FF
60 % Glycerol

TAE

40 mM TrisCl
20 mM Essigsäure
1 mM EDTA

TBE

90 mM Trisborat
2 mM EDTA

Quantitative real-time PCR

Die Ausgangsmenge spezifischer Nukleinsäuren in biologischen Proben ist zu gering für einen direkten Nachweis. Die Zielsequenz muss daher vervielfältigt werden. Die Untersuchung der Endmengen spezifischer PCR Produkte lässt keinen akkuraten Rückschluss auf die Ursprungsmenge zu, da im Verlauf der Vervielfältigung z.B. die Inhaltsstoffe zu limitierenden Faktoren werden können oder sich PCR Inhibitoren anreichern können. Zusätzlich werden geringste Unterschiede im PCR Verlauf zwischen den Proben vervielfältigt und verfälschen so die Aussage.

2. MATERIAL & METHODEN

Bei der quantitativen real-time PCR wird die Anreicherung der vervielfältigten PCR Produkte in der frühen exponentiellen Phase beobachtet, wenn die oben genannten Beeinträchtigungen noch keine Auswirkungen zeigen und die technische Fehlerfortpflanzung gering ist. Das Verfahren ermöglicht dadurch einen genaueren Rückschluss auf die ursprünglich vorhandene Kopienanzahl.

Die Nachweisgrenze liegt unterhalb von 100 Kopien und die Linearität der Detektion ist für mehr als 6 Zehnerpotenzen gegeben.

Detektion mit SYBR Green

Die Anreicherung von doppelsträngiger DNA (dsDNA) während der PCR kann mithilfe fluoreszierender, dsDNA bindender Farbstoffe nachgewiesen werden. Über den Zuwachs des PCR Produkts während der Zyklen kann so auf die Ursprungsmenge geschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde SYBR Green I verwendet. Dieser Farbstoff hat eine hohe Bindungsaffinität zur kleinen Furche der DNA Doppelhelix. Im ungebundenen Zustand zeigt SYBR Green nur eine geringe Fluoreszenz, die bei Bindung an dsDNA ungefähr um den Faktor 1000 höher ist (vgl. Abb. 2.2.1). Während der Denaturierung (A) wird die DNA zu Einzelsträngen geschmolzen. SYBR Green liegt frei in Lösung vor und zeigt nur geringe Fluoreszenz. Das Anlagern der Primer (B) erzeugt doppelsträngige DNA-Bereiche, an die sich der Farbstoff anlagern kann. Die Verlängerung der Primer führt zu mehr dsDNA, die Fluoreszenz erreicht das Maximum, wenn SYBR Green über die gesamte Länge des PCR Produkts gebunden ist (C).

2. MATERIAL & METHODEN

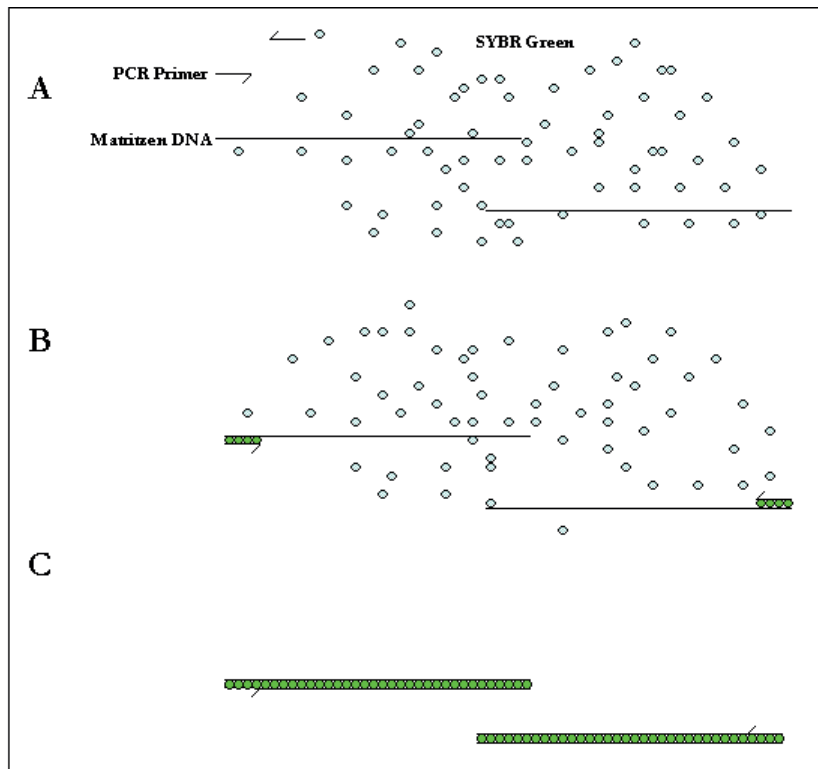


Abb. 2.2.1 Die Verwendung von SYBR Green I zur Quantifizierung in der real-time PCR. Die Erläuterung erfolgt im Text.

Dabei ist der Zuwachs an Fluoreszenz von der Ausgangsmenge abhängig. Zu beachten ist hierbei, dass auch nicht-spezifische dsDNA, wie z.B. Primer-Dimere, Fluoreszenz hervorruft. Aus diesem Grund ist besondere Sorgfalt beim Entwerfen der Primer nötig.

Schmelzkurven

Nach dem letzten Vervielfältigungszyklus wurden Schmelzkurven erstellt. Dazu wurden die PCR Ansätze schrittweise von 55 °C auf 95 °C (Erhöhung um 1 ° je 30 Sekunden) erhitzt und die Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Gleiche Produkte zeigten das gleiche Schmelzverhalten, über die Betrachtung der Schmelzkurven konnte also sichergestellt werden, dass keine unspezifischen PCR-Produkte vorlagen.

Durchführung der rt-PCR

Die rt-PCR wurde in 96er-Mikrotiterplatten durchgeführt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Verdünnungen von 10^9 bis 10^4 Kopien des Plasmids pUC21 eingesetzt. Die Standards und die Nullkontrollen wurden als Duplikate, die zu untersuchende cDNA in jeweils Dreifachwerten eingesetzt. Die PCR Ansätze wurden aus dem Brilliant Sybr Green QPCR Master Mix verdünnt, ihnen wurde ein Referenzfarbstoff in einer Endkonzentration von 30 nM zugesetzt. Mithilfe dieses Referenzfarbstoffs wurden Schwankungen im

2. MATERIAL & METHODEN

Reaktionsvolumen detektiert und die Fluoreszenzwerte des SYBR Green korrigiert. Zum Schluss wurden die spezifischen Primer in einer Endkonzentration von 16 nM und die cDNA zugegeben. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl je Ansatz.

Tab.2.2.3.2 PCR Bedingungen für die rt-PCR

Phase	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Anzahl der Wiederholungen
Aktivierung	Denaturierung	95	600	Einzelschritt
Amplifizierung	Denaturierung	95	30	40
	Anlagern der Primer	51	60	
	Synthese	72	30	
Schmelzen	Denaturierung	95	60	Einzelschritt
Dissoziationskurve	Renaturierung	51	30	Einzelschritt
	Temperaturerhöhung	+1	30	44

Ausgabe der Daten

Der RT-Cycler liefert für jeden Reaktionsansatz den Ct-Wert, d.h. den Wert, zu dem die erzeugte Fluoreszenz erstmals signifikant über dem Hintergrund liegt. Zusätzlich wird für jede Reaktion die über die Standardgerade ermittelte Kopienanzahl angegeben.

Die Herstellersoftware verfügt nicht über die Möglichkeit einer Normalisierung, so dass die Normalisierung und Auswertung der Daten nach folgenden Regeln durchgeführt wurde.

Normalisierung der Daten

Eine Normalisierung der Daten wurde durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Effizienz von RNA-Präparation und cDNA Synthese auszugleichen. Um normalisierte Werte für die einzelnen Gene zu erhalten, wurden die Einzelwerte der zu untersuchenden Gene durch die Einzelwerte der Gene für die Normalisierung dividiert. Auf diese Weise erhielt man aus den 3 Einzelwerten eine Gruppe von 9 normalisierten Werten. Diese Gruppen wurden zur Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS (Version 17). Da insgesamt 5 Gruppen miteinander verglichen wurden, war ein *t*-Test nicht geeignet. Zur Untersuchung der Beziehung der Proben zueinander wurde zunächst ein einfaktorielles ANOVA-Test durchgeführt. Hier werden die Mittelwerte *k* verschiedener Gruppen, die sich in einem Faktor unterscheiden (hier: Inkubation) miteinander verglichen. Als Nullhypothese gilt die

Vermutung, dass die Mittelwerte gleich sind. Unterscheiden sich mindestens zwei Gruppen statistisch signifikant von einander, so kann die Nullhypothese verworfen werden. Dabei können sich jedoch auch mehr als nur zwei Gruppen voneinander unterscheiden, das Ergebnis des Tests lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Beziehung der einzelnen Gruppen untereinander zu.

Hierzu sind weitere Tests nötig. Will man gezielt den Zusammenhang zwischen bestimmten Gruppen untersuchen, so können verschiedene *a priori* Tests durchgeführt werden, hierzu wird über sog. Kontraste definiert, welcher Zusammenhang (ist gleich, unterscheidet sich) zwischen bestimmten Gruppen getestet werden soll.

Im Gegensatz dazu testen *Post-Hoc* Testverfahren alle Gruppen gegeneinander und geben für die Beziehung für jeden Einzelvergleich wieder.

Zunächst wird mit dem Levene-Test auf Homoskedastizität (Varianzhomogenität) getestet. Bei Varianzgleichheit wird ein LSD-Test durchgeführt. Hierbei werden paarweise *t*-Tests zwischen je zwei Gruppen durchgeführt, wobei als Varianz jedoch nicht die Varianzen der beiden Gruppen verwendet werden, sondern die Varianz der gesamten Gruppen, was die Signifikanz erschwert. Trotzdem ist der LSD-Test liberal und detektiert zu viele Signifikanzen. Deshalb wird als zweiter Test die Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Hierbei handelt es sich um paarweise durchgeführte *t*-Tests, bei denen jedoch zur Verhinderung der Alpha-Inflation das Signifikanzniveau an die Menge der Stichproben angepasst wird.

Erwartungsgemäß liefert die Bonferroni-Korrektur deutlich weniger Signifikanzen, für die Untersuchung wird die Schnittmenge beider Tests verwendet.

Liegt keine Varianzgleichheit vor, so werden der Tamhane (T2) und der Dunnett-Test (T3) verwendet, die ebenfalls auf der Grundlage des *t*-Tests beruhen. Zwischen diesen beiden Tests sind die Unterschiede der detektierten Signifikanzen geringer, auch hier wird die Schnittmenge verwendet.

2.2.4 Arbeiten mit Protein

Proteinpräparation aus Zellkulturen

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, die Lösung im Anschluss abgesaugt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet und mit Transferpipetten in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch eine kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden die Zellen pelletiert, überschüssiges PBS wurde mit der Pipette abgenommen. Die Zellen wurden in 220 µl Proteinisolierungspuffer I aufgenommen (440 µl für HCT-Zellen) und durch Ultraschall aufgeschlossen. Zweimal 10 µl wurden für die Proteinbestimmung entnommen. Anschließend wurden 50 µl Proteinisolierungspuffer II (100 µl für HCT Zellen) zugesetzt,

2. MATERIAL & METHODEN

durch wiederholtes Überkopf-drehen des Gefäßes wurden die Lösungen miteinander gemischt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die entnommenen Aliquots wurden 10-fach verdünnt und zur Bestimmung der enthaltenen Proteinkonzentration verwendet. Danach wurden die Proben mit 1-fach Proteinpuffer auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt (i.d.R. 0,5 µg/µl für Fibroblasten, 1 µg/µl für HL-1 Zellen und 2 µg/ µl für HCT-Zellen).

Die Auftrennung der Proteine erfolgt elektrophoretisch im diskontinuierlichen System nach Lämmli (Lämmli, 1970) auf 15%igen Polyacrylamidgelen.

Proteinisolierungspuffer I

120 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5

2,4 % SDS

Proteinisolierungspuffer II

50 % Glycerol

25 % β-Mercaptoethanol

0,025 % Bromphenolblau

PBS (Zellkultur), pH 7,4

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes von Proteinlösungen können die Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien untersucht werden.

Die Intensität des Farbstoffs ist direkt proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen. Beim Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) wurden auf einen Teil Probe 20 Teile einer frisch angesetzten BCA/Kupfersulfatlösung gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Intensität des Farbstoffes wurde im Spektralphotometer bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde gegen eine Eichgerade aus gleich behandelten Verdünnungen von BSA in bekannter Konzentration errechnet.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine wurden nach Lämmli im diskontinuierlichen System in einer vertikalen Gelkammer aufgetrennt. Dieses System arbeitet mit der Kombination von zwei verschiedenen Puffern. Im Elektrophorese-Puffer befinden sich Tris und Glycin, in den

2. MATERIAL & METHODEN

Gelpuffern Tris und Cl⁻-Ionen. Im Sammelgel liegt der pH-Wert des verwendeten Tris-Cl-Puffers bei 6,8. Dies ist nah am isoelektrischen Punkt des Glycins im Elektrodenpuffer. Glycin hat also zu Beginn der Elektrophorese nur eine geringe Mobilität (Folge-Ion). Cl⁻ dagegen hat im Sammelgel eine hohe elektrophoretische Mobilität und wirkt als Leit-Ion. Das Proteingemisch hat im Sammelgel eine Mobilität, die zwischen denen der Folge- und der Leit-Ionen liegt. Beim Anlegen des elektrischen Feldes wandern alle Ionen mit gleicher Geschwindigkeit, dieses wird als Isotachophorese bezeichnet. Im Bereich der Leit-Ionen bildet sich eine niedrige, im Bereich der Folge-Ionen dagegen eine hohe Feldstärke aus, die Proteine befinden sich also in einem Feldstärke-Gradienten und bewegen sich mit konstanter Geschwindigkeit (Stapel-Effekt). Beim Erreichen des Trenngels erfahren die Proteine einen plötzlichen Reibungswiderstand, die Glycin-Ionen sind davon nicht betroffen und überholen die Proteine. Die Proteine befinden sich jetzt in einem homogenen Puffer, der Stapel löst sich auf und die Trennung beginnt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit 15%igen Trenngelen gearbeitet, die Übersichtung erfolgte jeweils mit 5%igen Sammelgelen. Aufgetragen wurden jeweils gleiche Proteinmengen (über die Konzentration bestimmt) der einzelnen Proben einer Präparationsreihe. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen (New England Biolabs). Die Auftrennung erfolgte bei 200 V und 250 mA für eine Stunde.

Blotting

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus den Kassetten entnommen, das Sammelgel wurde ebenso entfernt wie leere Bereiche des Geles. Die Gele wurden für 20 Minuten in Transferpuffer geschüttelt und bei 15 V und 3 mA/cm² Gel für 45 Minuten auf Nitrocellulosemembran geblottet.

Reversible Ponceau S Färbung

Zur Überprüfung der Blottingeffizienz wurde eine Färbung der Proteine mit Ponceau S durchgeführt. Dazu wurden die Membranen für 5 Minuten in Färbelösung (0,5 % Ponceau S in 1 % Essigsäure) geschüttelt. Durch sanftes Schütteln in dH₂O unter Sichtkontrolle wurde solange entfärbt, bis ein guter Kontrast zwischen den Banden und Hintergrund entsteht. Die Membranen wurden auf gleichmäßigen Transfer (Luftblasen) und gleiche Proteinmenge (Farbintensität) kontrolliert. Im Anschluss wurde die Membran durch Schütteln in dH₂O für weitere 5 Minuten vollständig entfärbt.

Immunonachweis

Die Membranen wurden für eine Stunde in 5 % Milchpulver in TBST geschüttelt, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach einer Stunde Inkubationszeit

2. MATERIAL & METHODEN

wurde die Blockinglösung verworfen. Der Primärantikörper wurde entsprechend den Herstellerangaben in TBST verdünnt und für 2 Stunden auf die Membranen gegeben. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind in Tab. 2.2 dargestellt. Für Antikörper, die nur in geringer Verdünnung verwendet werden konnten, wurden 5 ml (Anti-FKBP), bzw. 10 ml (Anti-IPP) Gesamtvolumen eingesetzt und die Membranen mit der Lösung in Folie eingeschweißt, um eine Austrocknung zu verhindern. Sonst wurden die Membranen mit der Primärantikörperlösung überschichtet und die Gefäße mit Parafilm verschlossen.

Tab 2.2 verwendete Antikörper

Primärantikörper		Verdünnung
Anti-LIS	monoklonal	1:5000
Anti-GAPDH	monoklonal	1:10000
Anti-Aktin	monoklonal	1:10000
Anti-FKBP52	polyklonal	1:1000
Anti-IPP	polyklonal	1:5000

Nach der Inkubation wurden die Lösungen abgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Primärantikörper können ohne Qualitätsverlust bis zu 10-mal wiederverwendet werden (Krajewski, 1996).

Durch dreimaliges Waschen mit PBS (je 5 Minuten) wurden Reste der freien Antikörper entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für eine Stunde in einer 1:1000 Verdünnung in TBST. An den Sekundärantikörper ist Meerrettichperoxidase konjugiert.

Nach der Inkubation wurden die Lösungen abgenommen und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert (5 x benutzt). Die Membranen wurden dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mithilfe des ECL⁺-Detektionkits den Herstellerangaben entsprechend.

Die Oxidation des Acridansubstrates durch die Meerrettichperoxidase generierte einen Acridiniumester, dessen Reaktion mit Peroxid unter milden alkalischen Bedingungen zu einer intensiven und bis zu 1 Stunde stabilen Chemiluminiszenz führte. Das emittierte Licht wurde mithilfe eines Autoradiographiefilmes detektiert. Die geeignete Expositionsdauer wurde bestimmt und der Röntgenfilm mit handelsüblichen Fotochemikalien entwickelt, mit 5 % Essigsäure gewaschen und fixiert. Nach dem Waschen mit Wasser wurden die Filme getrocknet und durch Scannen ein digitales Bild erzeugt.

2. MATERIAL & METHODEN

Transferpuffer

40 mM Glycin

50 mM TrisCl, pH 8,3

0,04 % SDS

20 % Methanol

PBS

120 mM NaCl

10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5

TBS

10 mM Tris pH 7,7,

150 mM NaCl

TBST

10 mM Tris pH 7,7,

150 mM NaCl

0,1 % Tween-20

3. Ergebnisse

Die Kandidaten aus der Spalthefe sollten in Zellkulturen von Mensch, Maus und Ratte validiert werden. Da Herzmaterial von Menschen für umfangreiche Untersuchungen nicht zur Verfügung steht, haben wir uns für die Verwendung verschiedener Zellkultursysteme entschieden: Die HL-1 Zelllinie wurde aus der atrialen Tumorzelllinie AT-1 (Maus) gewonnen. HL-1 Zellen können passagiert werden und bewahren dennoch ihre differenzierten kardialen morphologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften. Sie stellen somit ein geeignetes Kardiomyozytenmodell dar.

Neben Herzmuskelzellen sind Fibroblasten der häufigste Zelltyp im Herzen und auch in anderen Organen. Aus diesem Grund sollten die Effekte von Aldosteron auf primäre Kardiofibroblasten von Ratten untersucht werden. Als dritte Zelllinie wurden HCT116 Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um epitheliale Zellen aus einem humanen Colonkarzinom.

Während die HCT116 Zellen bereits im Labor etabliert waren und für die HL-1 Zellen eine detaillierte Pflegeanleitung vorlag, mussten für die primären Fibroblasten die optimalen Bedingungen erst gefunden werden.

Beim Wechseln des Systems von der Spalthefe zu Säugerzellen gab es verschiedene Besonderheiten zu beachten:

- Die unphysiologisch hohen Aldosteronkonzentrationen, die im Hefemodell nötig waren, da die Zellwand die freie Diffusion der Steroide beeinträchtigt (Bureik *et al.*, 2005), wurden für die Zellkulturen deutlich reduziert. Hier arbeiteten wir mit einer Aldosteronkonzentration von 10 nM. Diese Konzentration liegt noch über den physiologischen Werten, die zwischen 0,04-0,8 nM schwanken, allerdings werden die lokalen Hormonspiegel im Herzgewebe als 20-fach höher als im Plasma eingeschätzt (Silvestre *et al.*, 1998).
- Im Gegensatz zur Spalthefe verfügen alle verwendeten Säugerzellen über den Mineralocorticoidrezeptor. Alle in der Spalthefe beobachteten Effekte wurden unabhängig vom MR vermittelt. Neben der Fragestellung, ob in Säugerzellen die gleichen Proteine beeinflusst werden, sollte untersucht werden, auf welche Weise diese Effekte vermittelt werden. Hierzu wurde ein vergleichender Ansatz gewählt. Neben Zellen, die mit Aldosteron (im Folgenden auch Aldosteronprobe oder (A) genannt) bzw. mit Ethanol als Kontrolle (K) behandelt wurden, wurden mit Corticosteron behandelte Proben (als Corticosteronprobe oder (C) bezeichnet) untersucht. Dadurch sollten die Aldosteron-spezifischen Effekte von den allgemeinen Steroid-Effekten abgegrenzt werden können. Darüber hinaus wurden jeweils zwei Proben mit Spironolacton (10 µM für 30 min) vorbehandelt, um den Mineralokortikoidrezeptor zu blockieren, bevor ihnen Aldosteron (Kombinationsprobe (SA)), bzw. Ethanol (im Folgenden Spironolactonkontrolle (SK) genannt) zugesetzt wurde.

3.1 Etablierung der primären Kardiofibroblasten

Da Fibroblasten eine gefürchtete Kontamination in Primärzellkulturen darstellen, die schnell die anderen Zellen überwachsen, stellte es zunächst eine Überraschung dar, dass die Kultivierung in Standardmedium nicht gelang.

Nach der Präparation lagen die Zellen in Ham's F10 vor, das mit 10 % FCS und 5 % Pferdeserum angereichert war.

Da die Übernahme der Fibroblasten in der Regel am Tag nach der Präparation erfolgte, waren die Zellen bereits konfluent und hatten ihr Wachstum eingestellt (Kontaktinhibierung).

Nach dem Vereinzeln der Zellen mit 0,25 % Trypsin erfolgte die Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS. Die Fibroblasten wuchsen schnell an, teilten sich jedoch nicht oder nur wenig.

Versuche mit anderen Medien (Ham's F10, McCoys) mit einer 10 % igen Anreicherung FCS veränderte dieses Verhalten nicht. Eine Erhöhung des Serumanteils verlängerte die Vitalität der Zellen, führte jedoch zu keiner erhöhten Proliferation.

Das Verdünnen der Trypsinlösung auf 0,05 % ermöglichte die erfolgreiche Subkultivierung der Fibroblasten in allen genannten Medien. Zur Verzögerung der Seneszenz wurde das Medium mit 30 % Serum angereichert (Kues *et al.*, 2000). Ohne die Schädigung der Zellen durch Trypsin führte der hohe Serumgehalt zu schnellerem und dichterem Wachstum der Zellen (Holley, 1968).

3.2 Etablierung der quantitativen RT-PCR

3.2.1 Anforderungen der quantitativen RT-PCR

Um zuverlässige Aussagen über die unterschiedliche Expression von Zielgenen unter verschiedenen Versuchsbedingungen machen zu können, benötigt man Referenzgene, deren Expression von den Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird. Die erhaltenen Daten für die Zielgene werden über die der Referenzgene normalisiert. Unterschiedliche Ausbeuten in der RNA-Präparation können so ausgeglichen werden, die Normalisierung ermöglicht somit die relative Quantifizierung der Expression.

Eine absolute Quantifizierung über eine Standardkurve erfordert die Amplifizierung von DNA-Abschnitten bekannter Sequenzen aus unterschiedlich konzentrierten Ansätzen.

3.2.2 Normalisierung

Zur Normalisierung von RT-Daten werden häufig Haushaltsgene eingesetzt. Diese Gene werden in den Zellen permanent exprimiert, sind also leicht nachzuweisen und häufig in

3. ERGEBNISSE

hoher Kopienzahl vorhanden. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Expression von Haushaltsgenen entgegen früheren Annahmen häufig durch die Versuchsbedingungen beeinflusst werden (Schmittgen und Zakrajsek, 2000; Selvey *et al.*, 2001). Als bessere Alternative kann z. B. ribosomale 18S RNA eingesetzt werden (Goidin *et al.*, 2001).

Die RT-PCR kann in einem oder zwei Schritten erfolgen. Bei der RT-PCR in einem Schritt wird RNA als Matrize eingesetzt. Die Synthese von cDNA anhand der RNA erfolgt im gleichen Versuchsansatz wie die Vervielfältigung und die Quantifizierung der Zielgene.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte nach der Isolierung von Gesamt-RNA die Synthese von cDNA unter Verwendung von Oligo-dT Nukleotiden. Die erhaltene cDNA wird als Matrize in der RT-PCR eingesetzt, die RT-PCR wird also in zwei Schritten durchgeführt. Der Vorteil dieser Strategie liegt darin, dass die Lagerung von cDNA ohne gravierende Qualitätsverluste möglich ist und somit multiple Versuche mit dem gleichen Ausgangsmaterial möglich sind. Aus diesem Grund erschien die Verwendung von ribosomaler RNA zur Normalisierung nicht sinnvoll.

Es wurden für drei verschiedene ribosomale Proteine (*rps27*, *rpl 27*, *rpsp0*, bzw. *arbp*) Primer entwickelt und überprüft, dass die Expression dieser Zielgene unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wird. Die Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch die Plots für *rps27*, aufgetragen ist die Fluoreszenz gegen die Anzahl der PCR-Zyklen. Aufgrund der PCR-Effizienz, die in den einzelnen Gefäßen schwanken kann, können Schwankungen in der Endkonzentration auftreten. Aus diesem Grund wird die Zunahme der DNA in der exponentiellen Phase betrachtet, wenn die PCR-Bedingungen noch ideal sind.

3. ERGEBNISSE

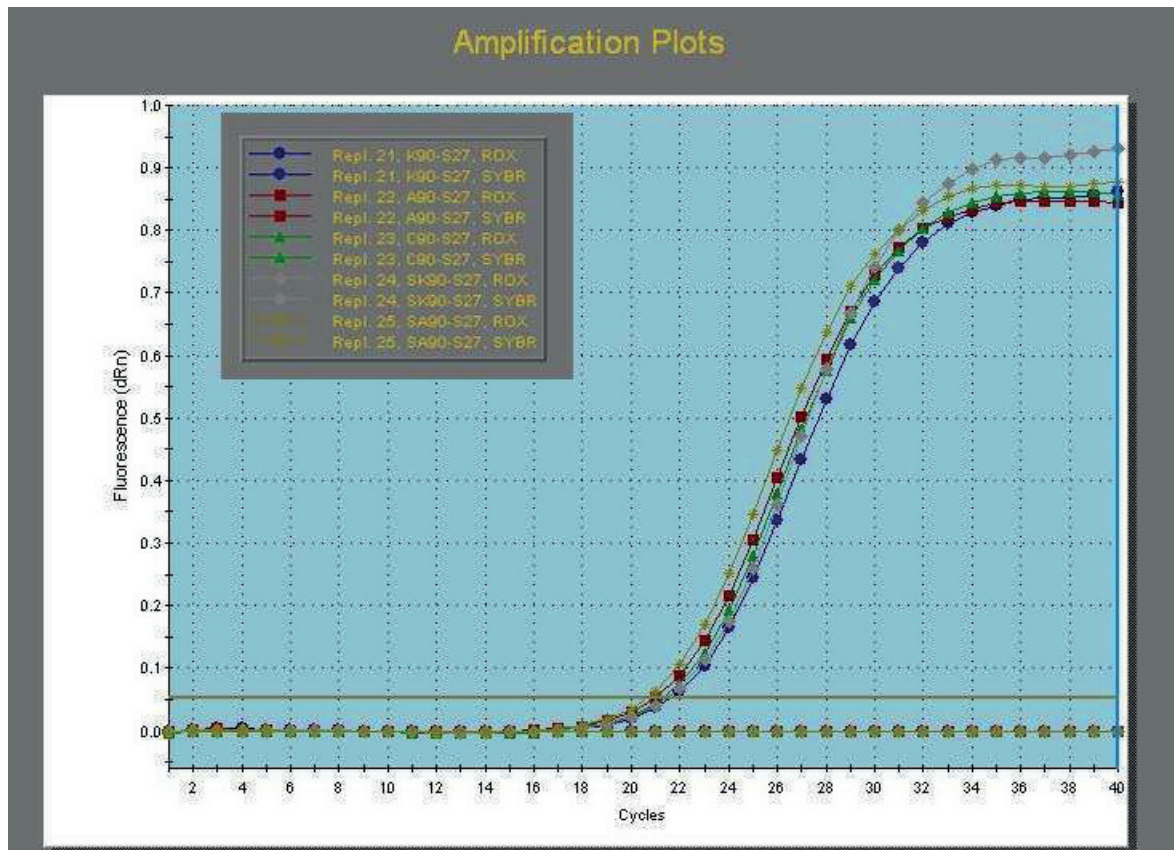


Abb 3.1 Plots der Vervielfältigung eines Abschnittes aus dem *rps27*-Gen. HL-1 Zellen wurden für 90 Minuten mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K) inkubiert. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Gesamt-RNA wurde präpariert und zur Synthese von cDNA unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern eingesetzt. Die erhaltene cDNA wurde als template für die RT-PCR verwendet. Gezeigt sind die gemittelten Werte aus jeweils Triplikaten. Den Proben wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe zugesetzt. ROX ist ein passiver Farbstoff, der zur Normalisierung des Volumens verwendet wird, während die Fluoreszenz von SYBR Green mit der Menge an dsDNA zunimmt.

3.2.3 Absolute Quantifizierung

Zur Erstellung einer Standardgeraden, an der die absolute Quantifizierung der Zielgene ermöglicht wird, wird das Plasmid pUC21 als Matrize eingesetzt. Über die Sequenz des Plasmides wird die Molmasse bestimmt. Verdünnungen von 10^9 bis 10^3 Kopien werden eingesetzt, verschiedene Primer ermöglichen die Vervielfältigung von Fragmenten von 163, 199 bzw. 249 Basenpaaren.

Abb. 3.2 zeigt als Beispiel die Standardkurve für den Längenstandard von 199 Basenpaaren. Die RT-PCR ermöglichte den Nachweis bis zu einer Verdünnung von ca. 10^3 Kopien. Die untersuchten Zielgene dieses Experimentes (in der Abbildung durch Dreiecke dargestellt) lagen in der Größenordnung von 10^3 bis 10^7 Kopien.

3. ERGEBNISSE

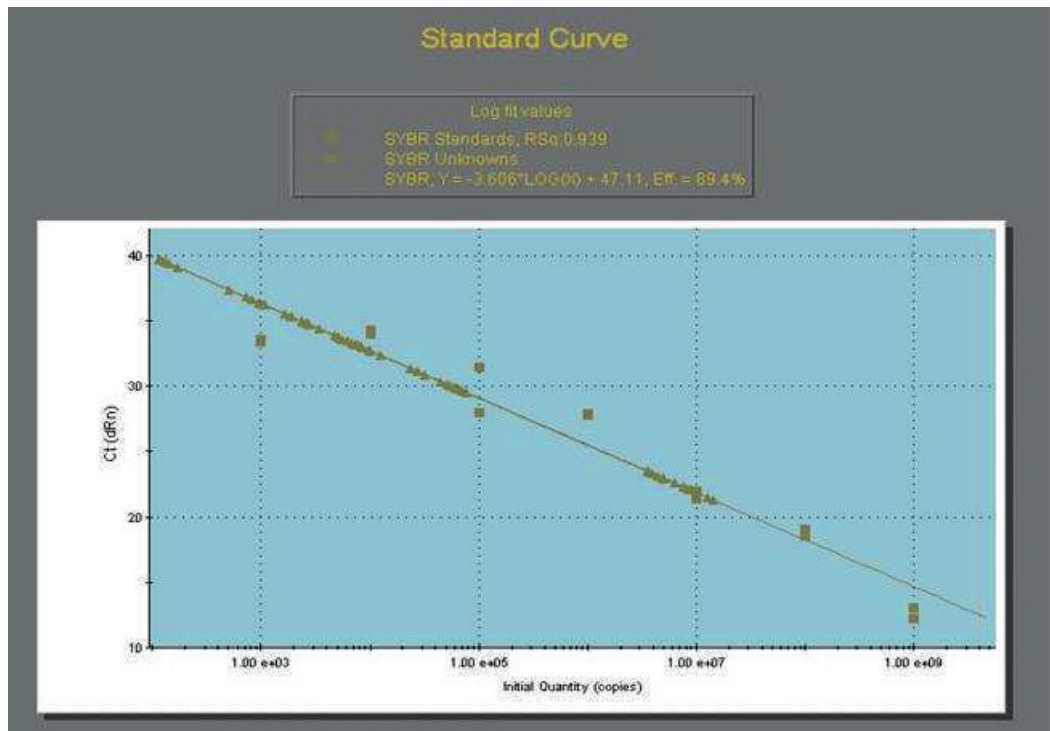


Abb 3.2 Standardkurve für LS199. Die Nachweisgrenze (Schwellwert) lag für das gezeigte Beispiel bei ca. 10^3 Kopien. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden Verdünnungen von 10^9 bis 10^3 Kopien pUC21 als Matrize eingesetzt (in der Grafik als Quadrate dargestellt). Die Ausgangskonzentration der untersuchten Zielgene wurde anhand dieser Gerade bestimmt. Im gezeigten Beispiel (cDNA aus HL-1-Zellen nach 60 Minuten Inkubation) lagen die Ausgangskonzentrationen zwischen 10^3 und 10^7 Kopien.

3.3 Untersuchungen auf RNA-Ebene (RT-PCR)

3.3.1 Expression der Kandidaten in Fibroblasten

Für die Untersuchungen wurden Kardiofibroblasten aus neonatalen Ratten verwendet. Die Tiere waren 1- 2 Tage alt, pro Präparation wurden 1- 2 Würfe verwendet, die Zellen wurden gepoolt. Bei Erhalt dieser präparierten Kardiofibroblasten waren die Zellen konfluent, sie wurden bei der ersten Passage 1 : 5 gesplittet. Die nächste Passage erfolgte 1 : 2 bei 75- 80 % Konfluenz.

Bei Erreichen von 80-100 % Konfluenz wurden die Zellen aus den erhaltenen 10 Schalen für parallele Experimente zu jeweils einer Inkubationszeit verwendet, aus der Hälfte wurde RNA, aus der anderen Hälfte Protein präpariert.

Jeweils 30 Minuten vor Beginn der Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, die Präinkubation mit Spironalacton erfolgte für 30 Minuten.

Die Expression sollte zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden, der Beobachtungszeitraum lag zwischen 30 und 240 Minuten in 30 Minuten Intervallen.

3. ERGEBNISSE

Zusätzlich wurden 45 Minuten gewählt, um im frühen Bereich eine bessere Aussage treffen zu können.

Die RT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt, die Normalisierung der Ergebnisse anhand des Referenzgens rps 27 erfolgte, indem die Einzelwerte der Messungen in Relation zu den Einzelwerten des Referenzgens gesetzt wurden. Die erhaltenen neun Einzelwerte wurden zur statistischen Auswertung mit SPSS verwendet. Für die graphische Darstellung wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt und die Werte für die einzelnen Proben in Relation zum Referenzgen nebeneinander gestellt.

30 Minuten Inkubationszeit

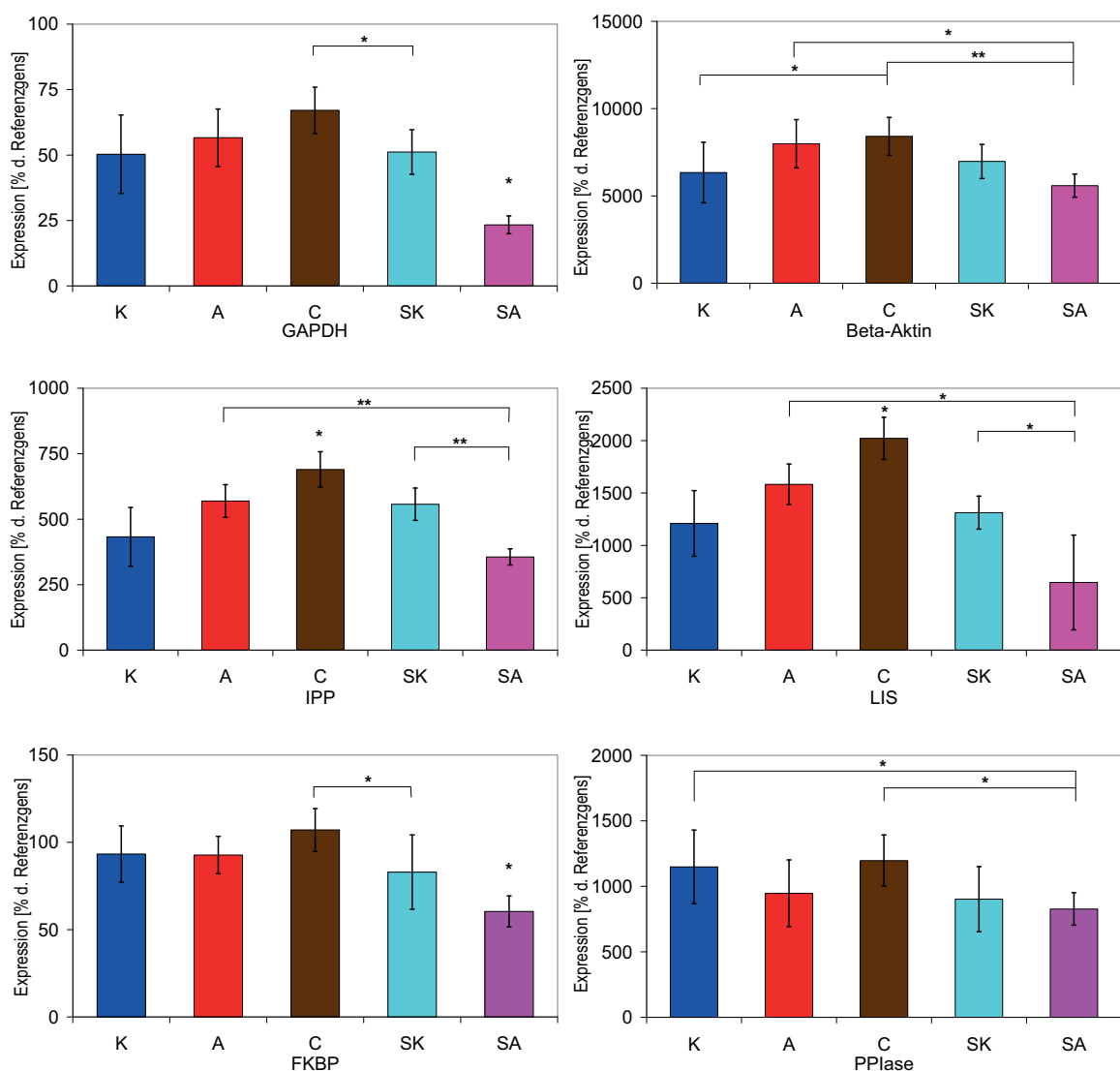


Abb. 3.3.1.1 Expressionsprofile der Kandidaten nach 30 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

3. ERGEBNISSE

Abb. 3.3.1.1 zeigt das Expressionsprofil für die untersuchten Kandidaten nach 30 Minuten. Die Expression ist für alle Kandidaten in der Corticosteronprobe am stärksten. Beta-Aktin ist am stärksten exprimiert, die Werte liegen zwischen 5400 (Spironolacton und Aldosteron) und 8500 % (Corticosteron) der Expression des Referenzgens. Die Expression in der Aldosteronprobe ist gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Die Spironolactonkontrolle liefert ebenso leicht erhöhte Werte, liegt aber unter dem Wert der Aldosteronprobe. Aldosteron in Kombination mit Spironolacton führt zur geringsten Expression, die Unterschiede zur Aldosteron- und zur Corticosteronprobe sind signifikant, ebenso die Werte zwischen der Corticosteronprobe und der Kontrolle. GAPDH ist mit Werten zwischen 23 und 67 % von allen Kandidaten am niedrigsten exprimiert. Die Verteilung innerhalb der Proben ist analog zum Beta-Aktin, die höchsten Expressionswerte finden sich für Corticosteron vor Aldosteron (57 %). Die beiden Kontrollen liegen mit 50 %, bzw. 51 % nach Präinkubation mit Spironolacton dicht beieinander. Die Aldosteronproben nach Spironolactonbehandlung liegen mit 23 % deutlich darunter, sind aber die einzige Gruppe, die sich signifikant von den Kontrollen unterscheidet ($p=0,027$).

Die Expression von LIS liegt mit Werten von 650 % bis 2000 % deutlich über der des Referenzgens. Das Minimum in den Kombinationsproben mit Spironolacton und Aldosteron lässt sich auf einen Ausreißer innerhalb der Werte zurückführen. Wird dieser Wert ausgeklammert, so liegen die Werte im gleichen Bereich wie die Spironolactonkontrolle. Der Ausreißer ist für die außerordentlich hohe Standardabweichung in dieser Gruppe verantwortlich. Der Wert in der Corticosteronprobe unterscheidet sich signifikant von allen anderen Gruppen ($p\leq 0,002$).

Das Expressionsprofil von IPP ähnelt denen von GAPDH und Beta-Aktin. Die Expression ist in den Corticosteronproben mit 690 % des Referenzgens am stärksten, die Spironolactonkontrolle liegt mit einem Wert von 560 % auf dem gleichen Niveau wie Aldosteron (570 %). Der Mittelwert der Kontrolle liegt mit 430 % unter diesen Werten, die Standardabweichung ist in der Kontrolle höher als in den anderen Proben, die Unterschiede sind nicht signifikant ($p=0,07$). Die Probe, die nach der Vorbehandlung mit Spironolacton mit Aldosteron versehen wurde, zeigt mit 360 % die geringste Expression, der Unterschied zur Kontrolle ist nicht signifikant ($p=0,97$), gegenüber der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle liegt Signifikanz vor ($p\leq 0,001$).

Die Expression von FKBP liegt im gleichen Größenbereich wie das Referenzgen, die Werte liegen zwischen 60 % in der Kombinationsprobe und 107 % in der Corticosteronprobe. Die Kontrolle und die Aldosteronprobe liegen nahe beieinander bei 93 %, die Spironolactonkontrolle mit 83 % leicht darunter, die Unterschiede zwischen den Proben sind nicht signifikant, lediglich der Wert der Kombinationsprobe unterscheidet sich statistisch

3. ERGEBNISSE

signifikant von der Kontrolle, der Aldosteron- und Corticosteronprobe ($p \leq 0,001$), nicht jedoch von der Spironolactonkontrolle ($p=0,39$).

PP1ase wird wesentlich stärker exprimiert als FKBP, die Werte liegen zwischen 830 % (Spironolacton und Aldosteron) und 1200 % (Corticosteron). Die Kontrolle liegt mit 1160 % in der gleichen Größenordnung wie die Corticosteronprobe. Die Aldosteronprobe (950 %) und die Spironolactonkontrolle (900 %) liegen demgegenüber etwas erniedrigt, die Unterschiede sind nicht signifikant. Lediglich die Kombinationsprobe unterscheidet sich von der Kontrolle und der Corticosteronprobe.

45 Minuten Inkubationszeit

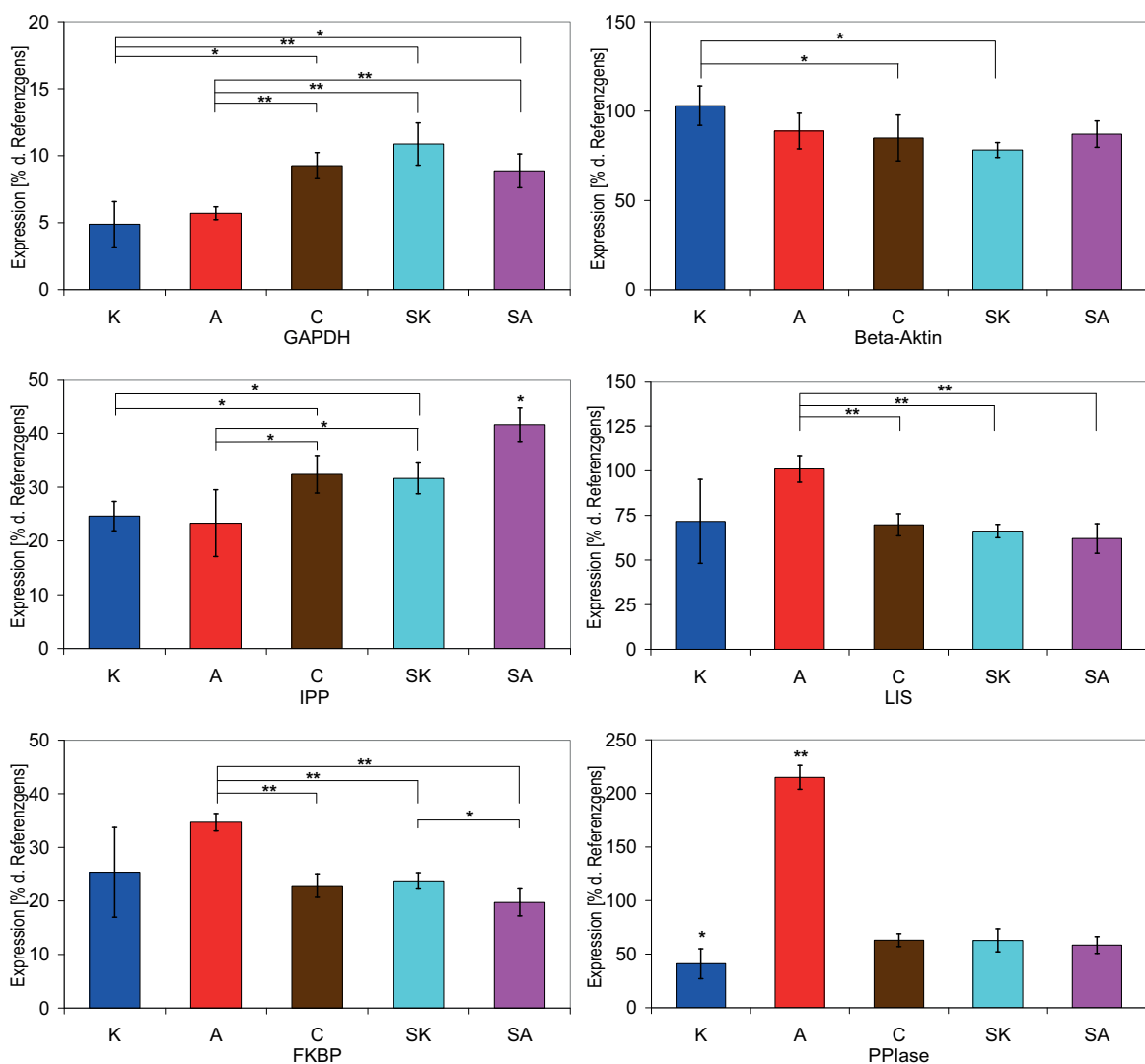


Abb. 3.3.1.2 Expressionsprofile der Kandidaten nach 45 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

3. ERGEBNISSE

Nach 45 Minuten Inkubation weisen die Proben für alle Kandidaten eine deutlich geringere Expression auf als in den Proben nach 30 Minuten. Die Expression von GAPDH liegt zwischen 5 % und 11 %, die Kontrolle weist hier den geringsten Wert auf, Aldosteron liegt mit 6 % auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle. Dem gegenüber ist der Wert für die Spironolactonkontrolle mit 11 % am höchsten, die Proben aus der Corticosteron- und Aldosteronbehandlung liegen mit jeweils 9 % auf einem vergleichbaren Niveau. Die Expression von Beta-Aktin liegt nach der 45-minütigen Inkubation in allen Proben auf einem einheitlichen Niveau, die Werte schwanken zwischen 78 % in der Spironolactonkontrolle und 103 % in der Kontrolle. Die Werte aus den mit Steroiden behandelten Proben liegen mit 85 % (Corticosteron) bzw. 87 % (Spironolacton und Aldosteron) und 89 % für Aldosteron dazwischen.

Das Expressionprofil für IPP zeigt stärkere Unterschiede zwischen den einzelnen Proben, die Werte für die Kontrolle und die Aldosteronprobe liegen mit 25 % und 23 % ebenso auf einem Niveau wie die Werte für Corticosteron und die Kombinationsprobe (jeweils 32 %). Lediglich in der Spironolactonkontrolle ergeben sich demgegenüber erhöhte Werte von 42 %. Für die übrigen Kandidaten LIS, FKBP und PPlase ergibt sich eine ähnliche Verteilung innerhalb der Proben. Die Expression ist in der Aldosteronprobe am stärksten, während sich die anderen Proben auf ungefähr gleichem Niveau bewegen.

Für LIS liegt der Expressionswert in der Aldosteronprobe mit 101 % auf dem gleichen Niveau wie das Referenzgen. Die Kontrolle liegt mit 72 % deutlich darunter, weist aber aufgrund eines Ausreißers im Referenzgen eine besonders hohe Standardabweichung (23 %) auf und ist nicht signifikant ($p=0,053$). Die Werte für Corticosteron, die Spironolactonkontrolle und die Kombinationsprobe liegen mit 70 %, 66 % und 62 % in der gleichen Größenordnung. Die Expression von FKBP ist ähnlich, die stärkste Expression findet sich in der Aldosteronprobe mit einem Wert von 34 % des Referenzgens. Die Kontrolle liegt mit 25 % gleich hoch wie die Spironolactonkontrolle (24 %). Auch die Corticosteronprobe hat mit 23 % der Expression des Referenzgens einen ähnlichen Wert, die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron liegt mit 19 % nur gering darunter. Wie bei der Expression von LIS sind die Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Aldosteronprobe aufgrund der hohen Standardabweichung in den Kontrollen nicht signifikant ($p=0,096$).

Bei der Expression von PPlase hingegen unterscheidet sich der Wert in der Aldosteronprobe statistisch signifikant von allen anderen Proben ($p\leq 0,008$). Die Expression liegt mit 215 % des Referenzgens massiv über der Kontrolle mit einem Wert von 41 %, aber auch über der Corticosteronprobe und der Spironolactonkontrolle (je 63 %), bzw. der Kombinationsprobe (59 %).

3. ERGEBNISSE

60 Minuten Inkubationszeit

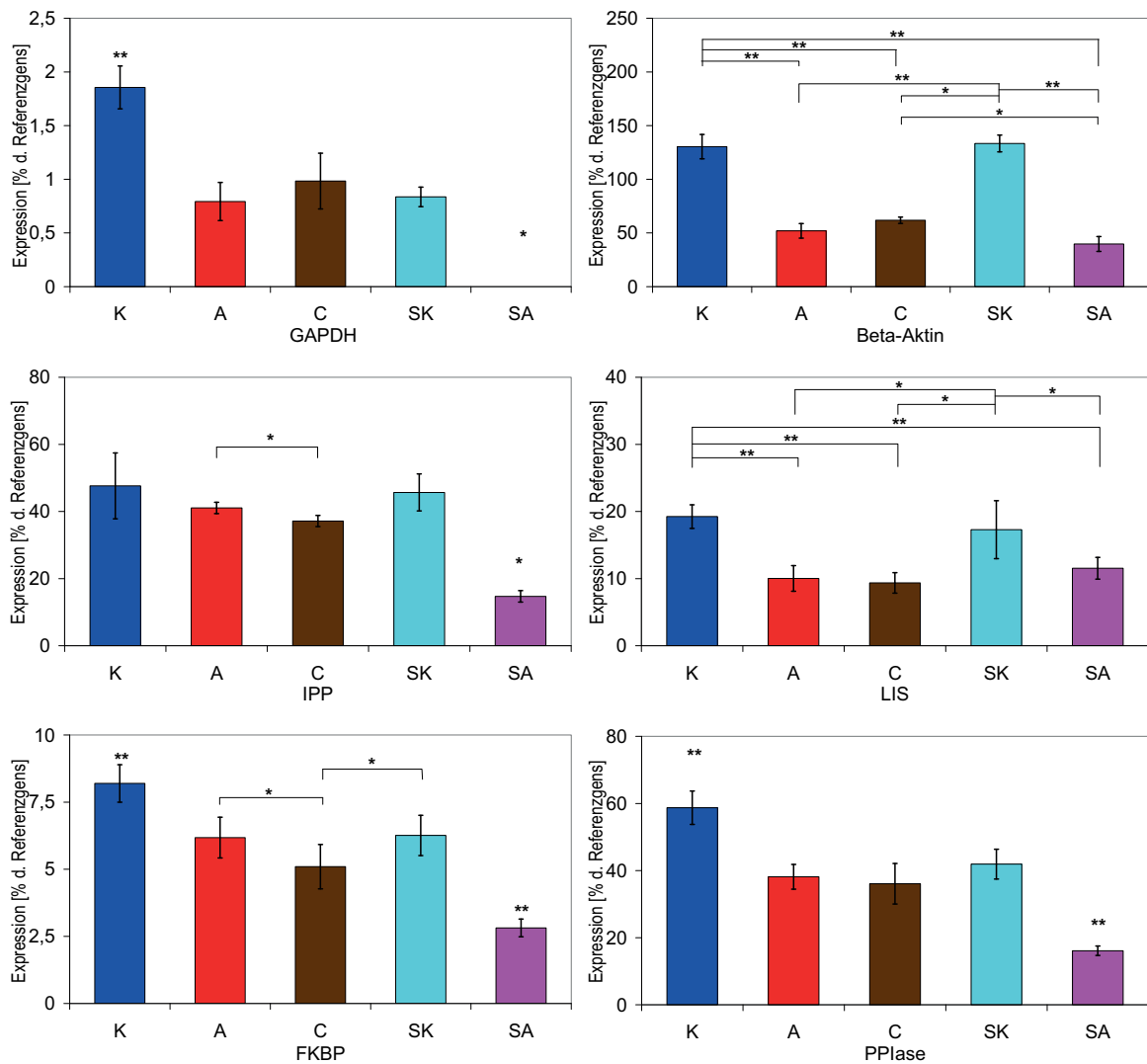


Abb. 3.3.3.3 Expressionsprofile der Kandidaten nach 60 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 60 Minuten Inkubationszeit zeigen sich deutliche Unterschiede im Vergleich des Expressionsprofils. Die Expression von GAPDH ist gegenüber den früheren Untersuchungszeitpunkten weiter abgesunken. Die Werte liegen in der Kontrolle mit lediglich 1,9% der Expression des Referenzgens am höchsten. Die Spironolactonkontrolle (0,8%) zeigt ebenso wie die Aldosteron- (0,8%) und die Corticosteronprobe (1,0%) eine noch verringerte Expression. In der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron ist keine Expression von GAPDH mehr nachweisbar. Damit unterscheiden sich sowohl die Kontrolle als auch die Kombinationsprobe von allen anderen Proben statistisch signifikant

3. ERGEBNISSE

($p \leq 0,043$), während die Unterschiede zwischen den restlichen Proben keine Signifikanz aufweisen.

Die Expression von Beta-Aktin liegt in den Kontrollen (130 % und 133 % für Spironolacton) über der der Expression nach 45 Minuten Inkubationszeit, in den mit Steroiden behandelten Proben ist die Expression jedoch noch niedriger als nach 45 Minuten, die Werte betragen 52 % für Aldosteron, 62 % für Corticosteron und 40 % für die mit Aldosteron behandelten Zellen nach der Präinkubation mit Spironolacton. Damit unterscheiden sich die Werte der Steroidproben statistisch signifikant von den Kontrollen ($p \leq 0,02$). Das Expressionprofil von IPP ähnelt Beta-Aktin insofern, dass beide Kontrollen gleich hohe Expression (48 %, bzw. 46 %) auf einem höheren Niveau als nach 45 Minuten zeigen. Die Werte für Corticosteron (41 %) und Aldosteron (37 %) liegen jedoch für die Expression von IPP ebenfalls höher als nach 45 Minuten. Lediglich der Wert für die Kombinationsprobe ist gegenüber dem früheren Zeitpunkt noch weiter abgesunken und beträgt nur 15 % der Expression des Referenzgens. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant gegenüber den anderen Proben ($p \leq 0,04$).

Bei der Expression von PPIase findet sich ebenso ein mit 16 % deutlich geringerer Wert für die Kombinationsprobe ($p \leq 0,001$). Der Wert der Kontrolle beträgt 59 %, während die Spironolactonkontrolle mit 42 % niedriger ist ($p \leq 0,001$). Die Expression in den Aldosteronproben (38 %) und den Corticosteronproben (36 %) liegt noch knapp unterhalb der Spironolactonkontrolle, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p \geq 0,321$). Gegenüber der Inkubationszeit von 45 Minuten ist die Expression in den Kontrollen stärker, in den Steroidproben jedoch geringer.

Die Expression von LIS ist im Vergleich zum früheren Zeitpunkt in allen Proben niedriger. Die Kontrolle (20 %) liegt etwas höher als die Spironolactonkontrolle (17 %). Die Expression in den Steroidproben ist dagegen verringert, in der Aldosteronprobe beträgt die Expression 10 %, nach Vorbehandlung mit Spironolacton 11,5 %, der Wert in der Corticosteronprobe ist mit 9 % am niedrigsten. Damit unterscheiden sich alle Steroidproben signifikant von der Kontrolle ($p \leq 0,001$), jedoch nicht voneinander.

Das Expressionsprofil von FKBP zeigt in allen Proben geringere Expression als nach 45 Minuten. In der Kontrolle ist die Expression mit 8 % am höchsten ($p \leq 0,001$), Aldosteron (6 %), Corticosteron (5 %) und die Spironolactonkontrolle (6 %) liegen auf einem Niveau, während die Kombinationsprobe mit 3 % den geringsten Wert aufweist. ($p \leq 0,002$).

3. ERGEBNISSE

90 Minuten Inkubationszeit

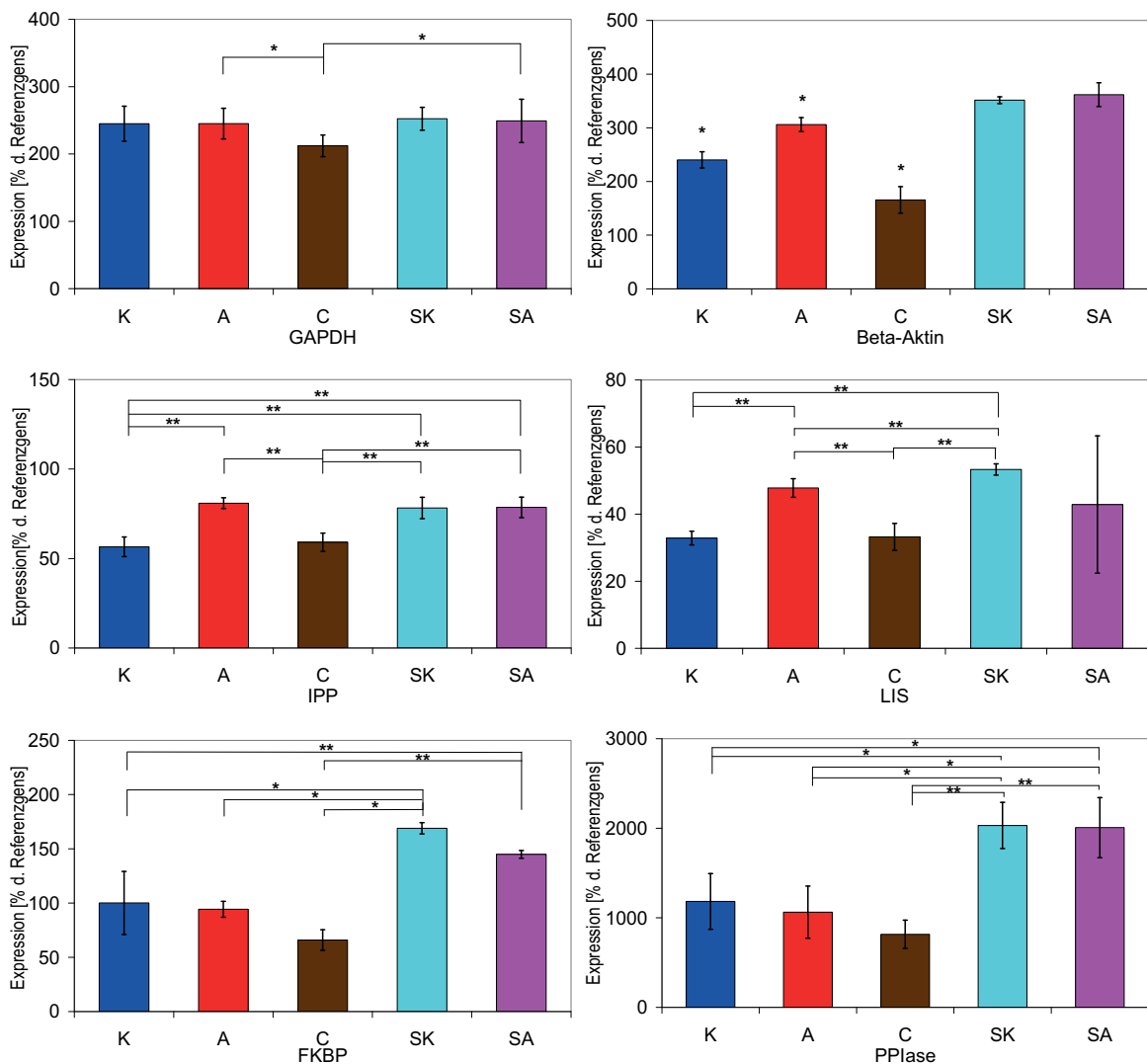


Abb. 3.3.3.4 Expressionsprofile der Kandidaten nach 90 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 90 Minuten Inkubationsdauer stellen sich die Expressionsprofile für die einzelnen Kandidaten unterschiedlich dar. Die Expression von GAPDH und Beta-Aktin ist höher als nach 60 Minuten, für GAPDH liegt die Expression in der Corticosteronprobe mit 212 % geringfügig unterhalb der anderen Proben, die um 250 % des Referenzgens exprimiert werden, der Wert der Corticosteronprobe ist signifikant gegen die Aldosteronproben und die Spironolactonkontrolle ($p \leq 0,041$), nicht jedoch gegen die Kontrolle ($p = 0,62$).

Bei Beta-Aktin ist die Expression in den mit Spironolacton vorbehandelten Proben am höchsten, die Kontrolle zeigt ebenso wie die Aldosteronprobe Werte um 350 % des

3. ERGEBNISSE

Referenzgens. Die Aldosteronprobe liegt mit 306 % bereits darunter, aber noch auf höherem Niveau als die Kontrolle mit 240 % . In der Corticosteronprobe ist die Expression mit 165 % am geringsten. Die Unterschiede der Kontrolle, der Aldosteronprobe und der Corticosteronprobe unterscheiden sich dabei jeweils signifikant von allen anderen Proben ($p \leq 0,001$).

Auch die Expression von IPP ist im Vergleich zur Inkubationsdauer von 60 Minuten gestiegen, für beide Aldosteronproben, sowie die Spironolactonkontrolle ergeben sich Werte um 80 % . Die Kontrolle und die Corticosteronprobe liegen mit 56 % und 60 % statistisch signifikant darunter ($p \leq 0,001$).

Für die Expression von LIS ergibt sich ein ganz ähnliches Bild, die Corticosteronprobe und die Kontrolle haben ähnliche Werte, die hier um 30 % liegen. Die Expression in der Aldosteronprobe ist demgegenüber erhöht, sie beträgt 48 % . In den Spironolactonproben unterscheiden sich die Werte aufgrund eines Ausreißers in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron, somit ergibt sich für die Spironolactonkontrolle ein Wert von 53 % gegenüber 43 % (bei 20 % Standardabweichung), die Kombinationsprobe unterscheidet sich aufgrund der hohen Standardabweichung statistisch gegen keine der anderen Proben. Das Expressionsprofil von FKBP stellt sich anders dar, hier ergeben sich jeweils ähnliche Werte für Kontrolle (100 %) und Aldosteron (94 %), bzw. Spironolactonkontrolle (170 %) und Aldosteron nach Vorbehandlung mit Spironolacton (145 %). Die Corticosteronprobe liegt mit einer Expression von 66 % unterhalb der anderen Proben und unterscheidet sich statistisch signifikant von den beiden Spironolactonproben ($p \leq 0,02$).

Die Expression von PPIase liegt in allen Proben deutlich oberhalb der nach 60 Minuten. Wie bei den anderen Kandidaten liegen die Daten für die beiden mit Spironolacton vorbehandelten Proben auf einer Höhe, sie betragen um 2000 % der Expression des Referenzgens. Die entsprechenden Proben ohne Spironolacton liegen ebenfalls nahe beieinander, sie zeigen 1180 % für die Kontrolle und 1060 % für die Aldosteronprobe. Nur Corticosteron führt zu einer etwas geringeren Expression von 820 %. Beide mit Spironolacton behandelten Proben unterscheiden sich jeweils statistisch signifikant von den drei anderen Proben.

3. ERGEBNISSE

120 Minuten Inkubationszeit

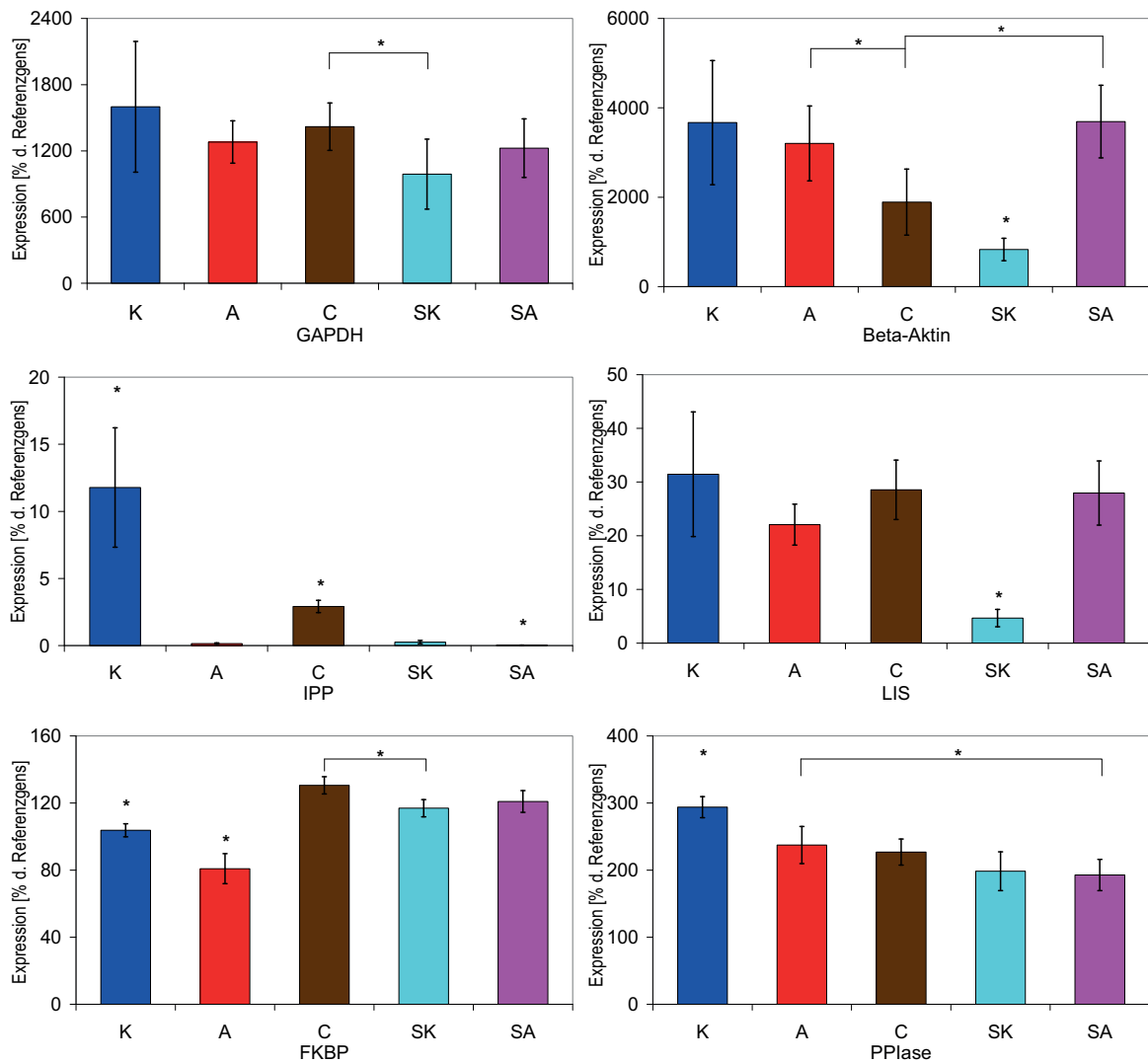


Abb. 3.3.3.5 Expressionsprofile der Kandidaten nach 120 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 120 Minuten Inkubationszeit ist die Expression von GAPDH in allen Proben auf einem hohen Niveau, die Werte liegen zwischen 1000 % (Spironolacton und Aldosteron) und 1600 % in der Kontrolle, der einzige statistisch signifikante Unterschied ist zwischen der Corticosteronprobe und der Spironolactonkontrolle ($p = 0,045$). Die Expression von Beta-Aktin ist ebenfalls stärker als nach 90 Minuten. Die beiden Aldosteronproben und die Kontrolle liegen mit Werten zwischen 3200 % und 3700 % verhältnismäßig nahe beieinander. Die Corticosteronprobe weist geringe Expression (1900 %) auf, die Spironolactonkontrolle ist mit 830 % noch weiter erniedrigt.

3. ERGEBNISSE

Die Expression von IPP hingegen ist nach 120 Minuten generell auf einem niedrigen Niveau, in den Kontrollen, die die höchste Expression zeigen, beträgt der Wert nur 12 % der Expression des Referenzgens. In den Corticosteronproben finden sich noch 3 % Expression, die übrigen Proben liegen mit Werten unter 0,5 % nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze, alle Proben unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle ($p \leq 0,03$), der Corticosteronprobe und der Kombinationsprobe.

Die Expression von LIS liegt in der gleichen Größenordnung wie nach 90 Minuten Inkubationszeit, die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten ergeben jedoch ein anderes Muster. Die Kontrolle zeigt mit 32 % den höchsten Expressionswert, liegt jedoch mit den mit Steroiden behandelten Proben auf einem Niveau, Corticosteron zeigt 29 % der Expression, die Kombinationsprobe 28 % und die Aldosteronprobe 22 % der Expression des Referenzgens. Nur die Spironolactonkontrolle zeigt mit 5 % einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,01$). Für die Expression von FKBP nach 120 Minuten Inkubationszeit ergeben sich naheliegende Werte für die beiden mit Spironolacton vorbehandelten Proben (117 % für die Kontrolle, 121 % für die Kombinationsprobe). Der Wert in den Corticosteronproben ist mit 130 % etwas höher. Die Kontrolle zeigt 104 % und die Aldosteronprobe weist mit 81 % den geringsten Wert auf. Damit unterscheiden sich die Aldosteronprobe Proben ($p \leq 0,006$) und die Kontrolle ($p \leq 0,01$) von allen anderen.

Wie nach 90 Minuten ist der Wert für die Expression von PPlase höher als der für FKBP. Auch hier liegen die Werte für die beiden mit Spironolacton behandelten Proben mit 198 % und 193 % auf einem Niveau. Die Behandlung mit Corticosteron resultiert in 227 % Expression, der Wert für die Aldosteronprobe liegt mit 237 % nur gering höher. In der Kontrolle ist die Expression mit 293 % am höchsten, sie unterscheidet sich signifikant von allen anderen Proben ($p \leq 0,001$).

3. ERGEBNISSE

150 Minuten Inkubationszeit

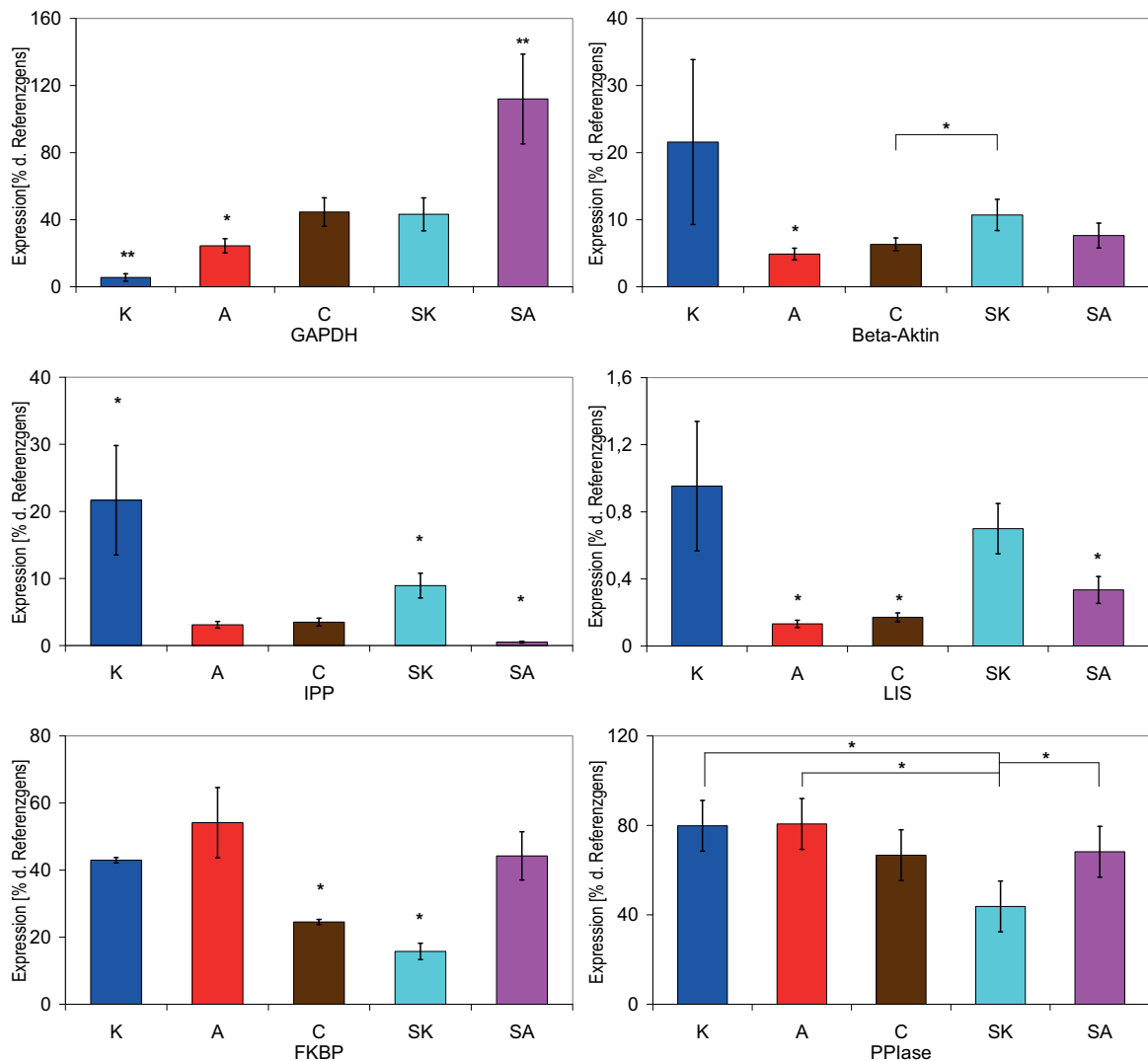


Abb. 3.3.3.6 Expressionsprofile der Kandidaten nach 150 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 150 Minuten Inkubationszeit ergeben sich erneut sehr geringe Expressionswerte für Beta-Aktin und GAPDH. Dabei zeigt die Kontrolle für GAPDH mit 6% die geringste Expression ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben), in der Aldosteronprobe ist die Expression mit 25% deutlich höher ($p \leq 0,003$ gegen alle Proben). Die Corticosteronprobe (45%) zeigt wie die Spironolactonkontrolle (46%) eine noch höhere Expression. Der Wert für die Aldosteronprobe nach der Vorbehandlung mit Spironolacton unterscheidet sich signifikant von den anderen Proben ($p \leq 0,001$), hier ist die Expression mit 112% am höchsten. Für die Kontrolle schwankten in diesem Experiment die Einzelwerte des Referenzgens stark, so dass sich für die Expression von IPP, LIS und Beta-Aktin eine sehr hohe

3. ERGEBNISSE

Standardabweichung ergibt. Die Expression von Beta-Aktin ist in der Kontrolle am stärksten ausgeprägt, der Wert liegt hier bei 22 % des Referenzgens und unterscheidet sich signifikant von der Aldosteronprobe ($p=0,035$). Die Expression von Beta-Aktin ist in der Spironolactonkontrolle (11 %) etwas höher als in der entsprechenden Aldosteronprobe (8 %), deren Expression noch über der der Corticosteronprobe mit 6 % bzw. der Aldosteronprobe ohne Vorbehandlung mit Spironolacton (5 %) liegt.

Die Expression von IPP ist ebenfalls für die Kontrolle am höchsten, hier liegt der Wert bei 21 % ($p\leq 0,014$ gegen alle Proben). In der Spironolactonkontrolle liegt der Wert bei 9 % der Expression des Referenzgens. Die Werte für die Aldosteron- und Corticosteronprobe liegen mit 3,1% bzw. 3,5% nahe beieinander, unterscheiden sich jedoch von den Spironolactonproben ($p\leq 0,01$). Die Kombination von Spironolacton und Aldosteron führt zur niedrigsten Expression von 0,5 % des Referenzgens ($p\leq 0,001$ gegen alle Proben).

Die Expression von LIS folgt hinsichtlich der Verteilung auf die einzelnen Proben dem gleichen Muster. Die Kontrolle liegt für LIS mit 1% Expression am höchsten. Die Spironolactonkontrolle zeigt noch 0,7% Expression, die Aldosteronprobe nach der Vorbehandlung mit Spironolacton 0,3% ($p\leq 0,12$ gegen alle Proben). In der Aldosteronprobe ist mit 0,13% die geringste Expression von LIS zu finden ($p\leq 0,02$ gegen die Kontrolle und die Spironolactonkontrolle), die Corticosteronprobe liegt mit 0,17% knapp darüber.

Für FKBP und PPlase liegt die Expression auf einem etwas höheren Niveau. Für PPlase liegen die Werte für die Kontrolle (80 %), sowie die beiden Aldosteronproben am nächsten beieinander, wobei die Vorbehandlung mit Spironolacton zu einer etwas geringeren Expression führt (70 % gegenüber 80 %). Die Spironolactonkontrolle zeigt mit 45 % sogar einen deutlich niedrigeren Wert. Die Expression in den mit Corticosteron behandelten Proben liegt mit 67 % etwas unter dem Wert des Aldosterons.

Für FKBP zeigen die mit Aldosteron behandelten Zellen jeweils höhere Werte als die Kontrollen, verpassen aber die Signifikanz ($p=0,379$). In der Kontrolle finden sich 43 % der Expression des Referenzgens, in der Aldosteronprobe sind es 54 %. Die Vorbehandlung mit Spironolacton liefert in den Kontrollen 16 % der Expression, bei weiterer Behandlung mit Aldosteron werden 44 % der Expression des Referenzgens erzielt. Der Wert für Corticosteron liegt mit 25 % zwischen dem von Aldosteron und Spironolacton.

3. ERGEBNISSE

180 Minuten Inkubationszeit

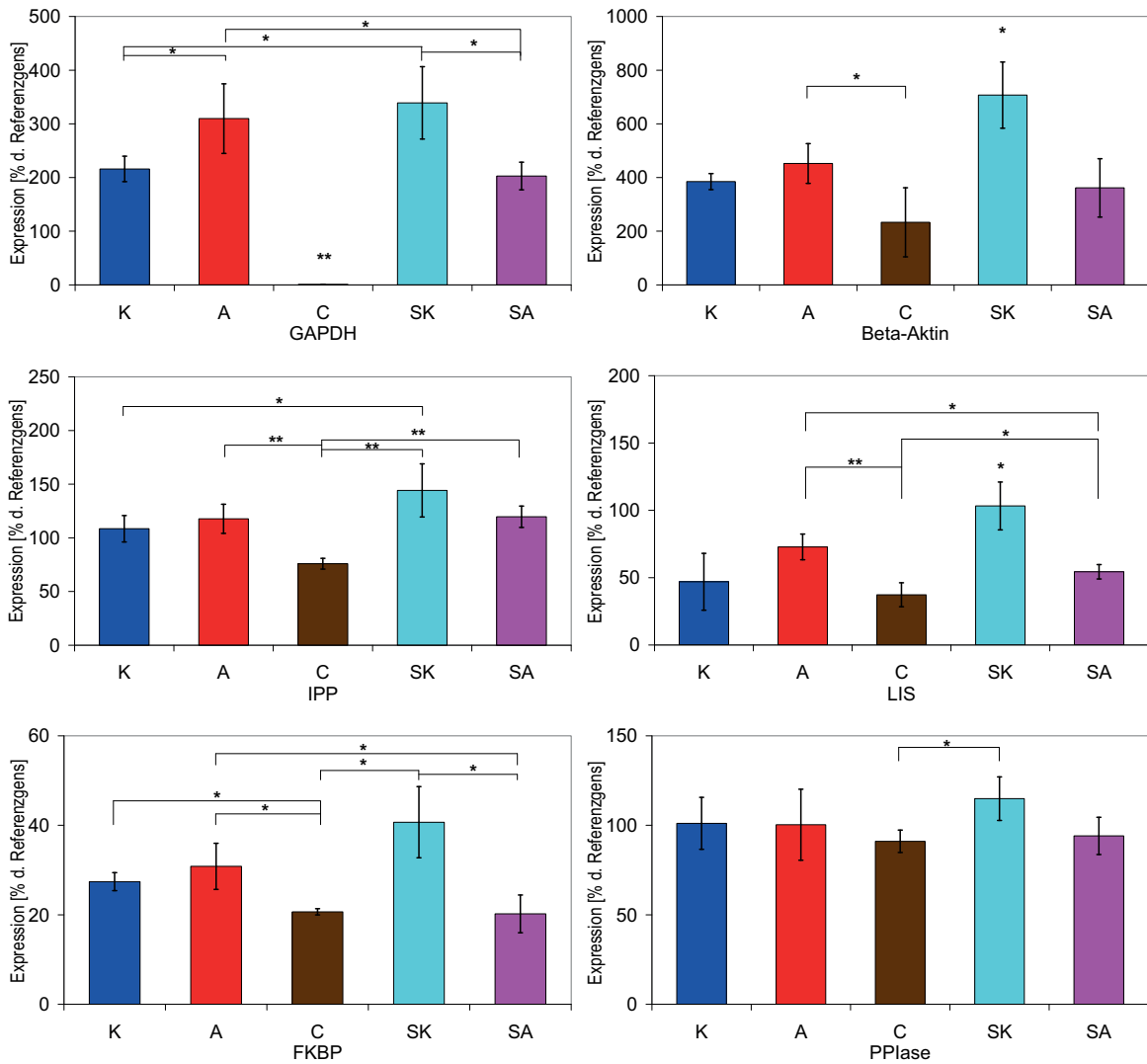


Abb. 3.3.3.7 Expressionsprofile der Kandidaten nach 180 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Die Expression von GAPDH nach 180 Minuten Inkubationszeit liegt auf einem höheren Niveau als nach 150 Minuten. Eine Ausnahme davon stellt die mit Corticosteron behandelte Probe dar, in der lediglich 0,8 % Expression nachgewiesen werden konnten. In der Kontrolle liegt der Wert bei 216 %, die Vorbehandlung mit Spironolacton führt zu einer erhöhten Expression von 340 %. Während in der mit Aldosteron behandelten Probe die Expression mit 310 % einen erhöhten Wert aufweist ($p=0,02$ gegen die Kontrolle), führt die Kombination von Spironolacton und Aldosteron zu keiner veränderten Expression gegenüber der Kontrolle, der Wert liegt bei 202 %.

3. ERGEBNISSE

Das Expressionprofil für Beta-Aktin ähnelt dem des GAPDH. In der Kontrolle erreicht die Expression Werte von 385 % des Referenzgens, die Behandlung mit Aldosteron führt zu erhöhter Expression von 450 % (keine Signifikanz, $p=0,252$). Die Spironolactonkontrolle liegt mit einem Wert von 700 % deutlich über der Kontrolle, während die Kombination von Spironolacton mit Aldosteron zu Werten von 360 % führt, was in etwa der Kontrolle entspricht. Die Corticosteronproben zeigen nach 180 Minuten für alle Kandidaten die geringste Expression, für Beta-Aktin beträgt diese 230 % des Referenzgens.

Die Expression von IPP in den verschiedenen behandelten Proben unterscheidet sich nach 180 Minuten Inkubationszeit nur geringfügig. Corticosteron weist mit 76 % den geringsten Wert auf, die Kontrolle liegt bei 108 %. Die Inkubation mit Spironolacton erhöht die Expression auf 144 %, damit liegt der einzige signifikante Unterschied zur Kontrolle vor ($p=0,037$). Dieser Effekt ist für die kombinierte Probe aus Spironolacton und Aldosteron nicht zu beobachten, der Wert liegt bei 120 % und unterscheidet sich nicht vom Wert der mit Aldosteron allein behandelten Proben (117 %).

Im Expressionsprofil von LIS liegen die Werte für die mit Aldosteron behandelten Proben (73 %) über denen der Kontrollen (47 %), die Spironolactonkontrollen zeigen jedoch einen höheren Wert (103 %) als die Kombinationsproben aus Spironolacton und Aldosteron (54 %). Die Corticosteronproben zeigen auch hier die geringste Expression (37 %), sie liegt auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle ($p=0,875$). Die Expression von FKBP ist nach 180 Minuten Inkubationszeit ähnlich verteilt wie die des IPP. Die Expression in den Kontrollen (27 %) liegt leicht unter der in den Aldosteronproben (31 %). Nach der Vorbehandlung mit Spironolacton erhöht sich die Expression in der Kontrolle auf 41 %, die Kombination aus Spironolacton und Aldosteron hingegen zeigt Expressionswerte (20 %) unterhalb der der Kontrolle auf gleichem Niveau wie Corticosteron (20 %).

Für PPIase ist die Expression höher als für FKBP, die Werte liegen zwischen 91 % (Corticosteron) und 115 % (Spironolacton), unterscheiden sich aber nur geringfügig, die Kontrolle (101 %) und die Aldosteronprobe (100 %) liegen zwischen den Werten der Spironolactonkontrolle (115 %) und der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron (94 %).

3. ERGEBNISSE

210 Minuten Inkubationszeit

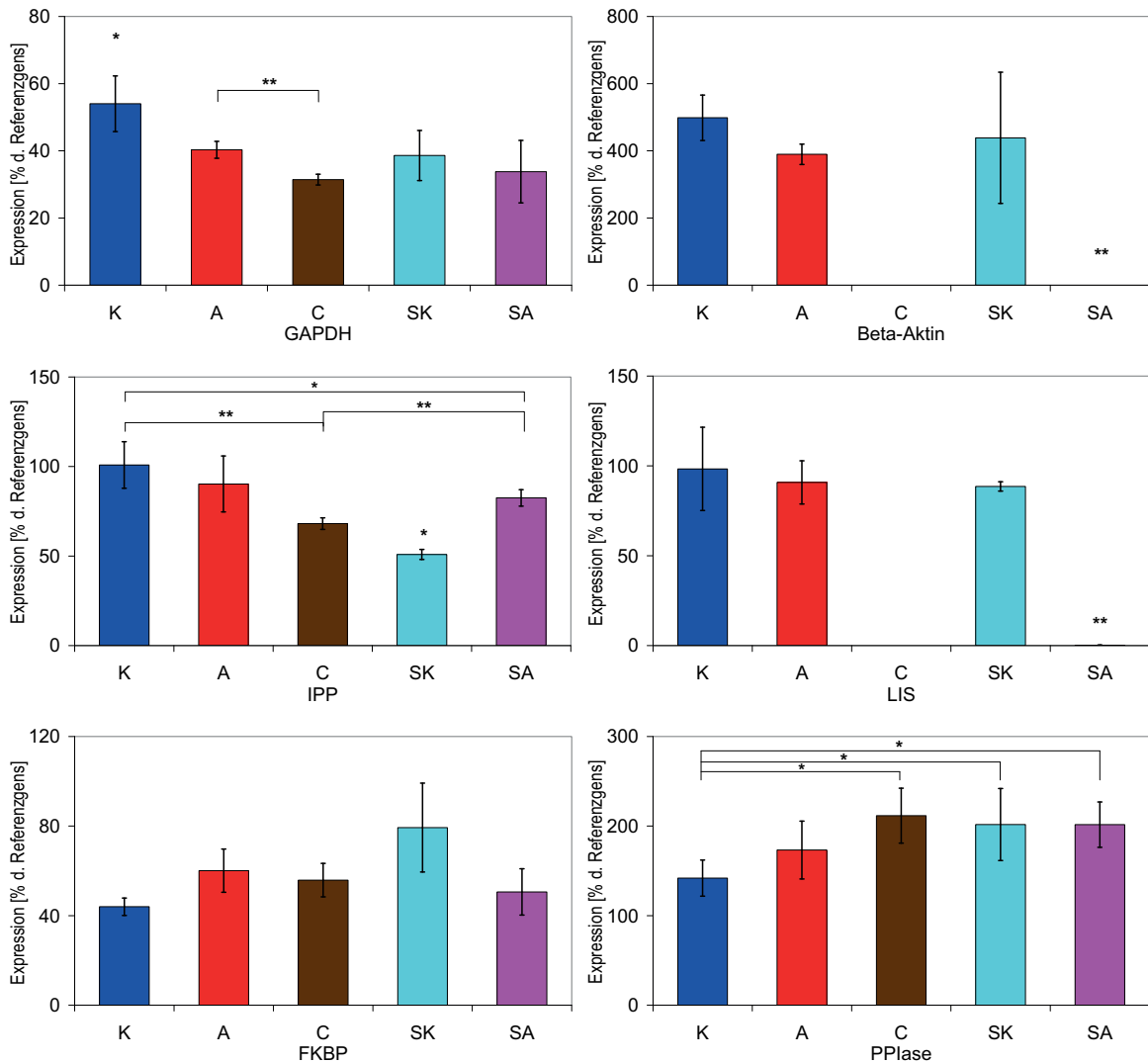


Abb. 3.3.3.8 Expressionsprofile der Kandidaten nach 210 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Die Abbildungen der Expressionsanalysen nach 210 Minuten Inkubationszeit für LIS und Aktin enthalten keine Werte für Corticosteron. Beim Pipettieren der Platte wurden für den Standard statt Duplikate versehentlich Triplikate eingesetzt, so dass auf der Platte nicht genügend Platz zur Verfügung stand. Um das Experiment nicht verwerfen zu müssen, wurden die Corticosteronproben für LIS und Aktin weggelassen. Die RT-PCR lieferte für die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron keine Werte für Aktin bzw. sehr geringe Werte für LIS. Da sich jedoch die Werte der Kontrolle, der Kontrolle nach Spironolacton und der Aldosteronprobe nicht voneinander unterschieden, wurde von der Wiederholung des Experiments abgesehen.

3. ERGEBNISSE

Die Expression von GAPDH ist in der Aldosteronprobe mit 40 % ungefähr gleich hoch wie in den mit Spironolacton behandelten Kontrollen (39 %). Die mit Spironolacton vorbehandelten Aldosteronproben führen zu etwas geringeren Werten (34 %), liegen aber noch über den Werten aus den mit Corticosteron behandelten Proben (31 %). Die Kontrolle zeigt mit 54 % der Expression des Referenzgens die höchste Expression. Damit ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und allen anderen Proben ($p \leq 0,009$), während die Spironolactonkontrolle sich außer von der Kontrolle von den anderen Proben nicht unterscheidet ($p \geq 0,187$). Die Expression von IPP zeigt keine Unterschiede zwischen der Kontrolle (100 %) und der Aldosteronprobe (90 %), die Spironolactonkontrolle liegt jedoch signifikant ($p \leq 0,014$) unter allen Proben (50 %), während die Kombination aus Spironolacton und Aldosteron zu einer signifikant höhere Expression (83 %) gegenüber der Spironolactonkontrolle ($p \leq 0,001$), nicht jedoch gegenüber Kontrolle und Aldosteronprobe führt.

Die Expression von FKBP ist in der Spironolactonkontrolle mit 80 % höher als in der Kontrolle (44 %). Die beiden Aldosteronproben liegen mit Werten von 60 % bzw. 50 % (nach Vorbehandlung mit Spironolacton) dazwischen, ebenso das Corticosteron mit 55 % der Expression des Referenzgens.

Die Expression von PPIase ist wieder höher als die des FKBP. Die Kontrolle hat einen Wert von 142 %, die entsprechende Aldosteronprobe liegt nur geringfügig höher (173 %) ($p = 0,08$). Beide mit Spironolacton vorbehandelten Proben liefern mit 201 % die gleiche Expression, der Wert für Corticosteron liegt hier mit 211 % etwas höher.

3. ERGEBNISSE

240 Minuten Inkubationszeit

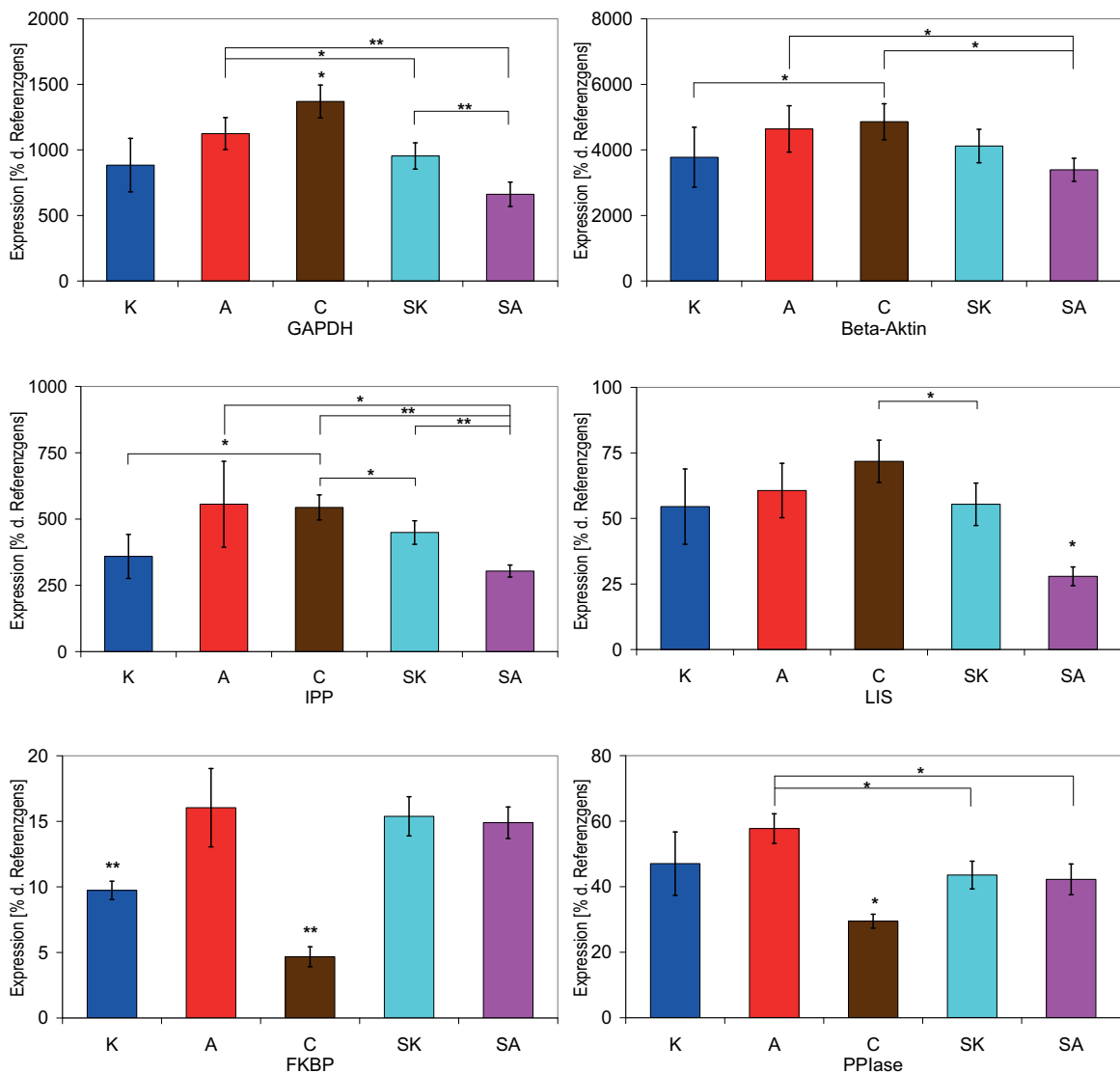


Abb. 3.3.3.9 Expressionsprofile der Kandidaten nach 240 Minuten Inkubationszeit in Fibroblasten. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Die Expression von GAPDH nach 240 Minuten Inkubationsdauer ist auf einem hohen Niveau. Der höchste Wert wird für Corticosteron erzielt (1370 %), beide Kontrollen liefern vergleichbare Werte (880 %, bzw. 950 % nach der Vorbehandlung mit Spironolacton). Die mit Aldosteron behandelten Proben führen zu einer nicht signifikant erhöhten Expression (1120%), nach Vorbehandlung mit Spironolacton führt eine Inkubation mit Aldosteron jedoch nicht zum gleichen Ergebnis, die Expression liegt in diesem Fall unterhalb der der Kontrolle (660 %) ($p \leq 0,001$).

3. ERGEBNISSE

Auch für Beta-Aktin ist die Expression hoch, Corticosteron erzielt die höchste Expression mit 4800 %, liegt damit aber nur geringfügig über der Expression in der Aldosteronprobe (4600 %). Die beiden Kontrollen liegen im gleichen Bereich (3800 %, bzw. 4100 % nach der Vorbehandlung mit Spironolacton). Die Kombination aus Spironolacton und Aldosteron senkt die Expression auf knapp unterhalb der Kontrollen ab (3400 %), signifikante Ergebnisse werden dabei nicht erzielt. Die Expression von IPP ist für Aldosteron (550 %) und Corticosteron (540 %) deutlich stärker als für die Kontrolle (360 %) und die Spironolactonkontrolle (450 %), liegt wegen der hohen Varianz jedoch außerhalb der Signifikanz. Die Expressionswerte für IPP in den Kombinationsproben aus Spironolacton und Aldosteron liegen mit 303 % unterhalb der Expression in den Spironolactonkontrollen ($p \leq 0,001$).

Das Expressionsprofil von LIS liefert keine signifikanten Unterschiede in der Expression in der Kontrolle (54 %), der Aldosteronprobe (60 %) und der Spironolactonkontrolle (55 %). Die Expression in der Corticosteronprobe ist jedoch signifikant höher als in der Spironolactonkontrolle (72 %) ($p = 0,006$). Für die Aldosteronprobe nach der Vorbehandlung mit Spironolacton ergibt sich eine signifikant niedrigere Expression von 28 % gegen alle Proben ($p \leq 0,004$).

FKBP ist nach 240 Minuten Inkubationszeit niedrig exprimiert, in der Kontrolle werden 10 % der Expression des Referenzgens erzielt, in der Corticosteronprobe liegt die Expression mit 5 % noch niedriger. In den beiden Aldosteronproben und der Spironolactonkontrolle liegt die Expression auf dem gleichen Niveau um 15 %.

PPlase wird erneut stärker exprimiert als FKBP, die beiden Spironolactonproben liegen mit 44 % (Spironolactonkontrolle) und 42 % (Spironolacton und Aldosteron) auf dem gleichen Niveau. Die Expression in der Kontrolle liegt etwas höher bei 47 %, in der Aldosteronprobe noch etwas höher bei 58 % . Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung in der Kontrolle gibt es auch hier keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die verringerte Expression in der Corticosteronproben (29,5 %) ist signifikant unterschiedlich von allen anderen Proben ($p \leq 0,041$).

3.3.2 Expression der Kandidaten in HL-1 Zellen

Für die Experimente mit HL-1 Zellen wurden die Zellen der Passagen 58-60 verwendet. Die RT-PCR Experimente wurden mit Triplikaten durchgeführt, zur Normalisierung wurden die erhaltenen Einzelwerte durch die Einzelwerte des Referenzgens rps27 dividiert, die erhaltenen 9 Einzelwerte wurden als eine Gruppe betrachtet und zur statistischen Auswertung mit SPSS (ANOVA) eingesetzt. In den Abbildungen sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung in Relation zum Referenzgen dargestellt.

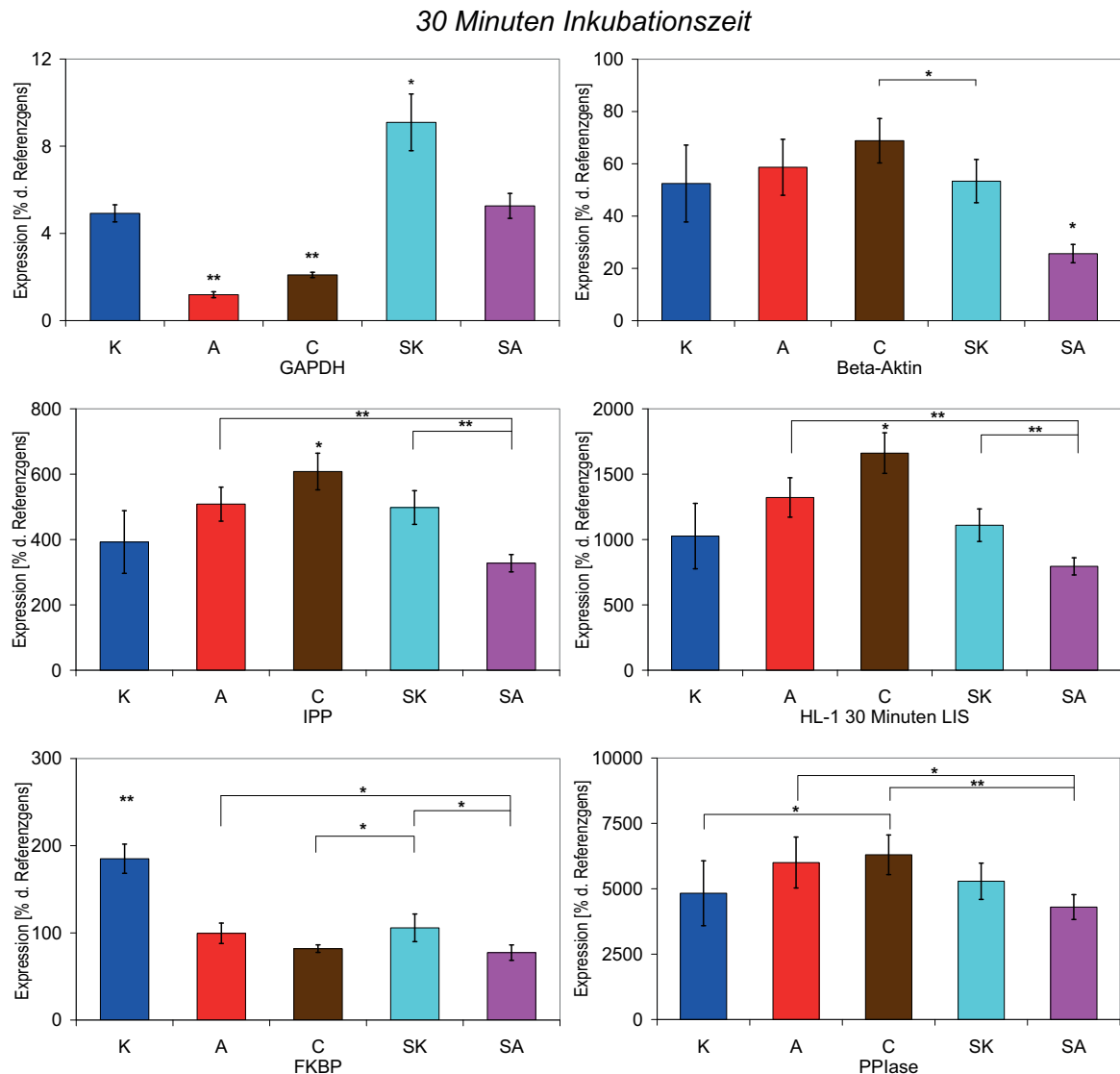


Abb. 3.3.2.1 Expressionsprofile der Kandidaten nach 30 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

3. ERGEBNISSE

Nach 30 Minuten Inkubationszeit ist die Expression von GAPDH bereits deutlich beeinflusst. In der Kontrolle liegt die Expression bei 5 % des Referenzgens. Die Vorbehandlung mit Spironolacton erhöht die Expression auf einen Wert von 9 % ($p=0,03$). Im Vergleich zur Kontrolle ist die Expression in der Aldosteronprobe deutlich verringert, hier beträgt der Wert 1,2 % ($p\leq 0,001$). Die Corticosteronprobe liegt mit 2,1 % etwas höher, liegt aber ebenfalls signifikant unterschiedlich zur Kontrolle vor ($p\leq 0,001$). Die Kombination aus Spironolacton und Aldosteron führt zu einer Expression von 5,3 %, damit ist der Unterschied zur Kontrolle nicht signifikant ($p=0,95$), im Vergleich zur Spironolactonkontrolle ist die statistische Signifikanz jedoch gegeben ($p=0,03$). Für Beta-Aktin stellt sich das Expressionsprofil anders dar. Hier finden wir die höchste Expression in der Corticosteronprobe mit 69 % des Referenzgens. Der Unterschied zur Kontrolle und der Aldosteronprobe ist nicht signifikant, in der Kontrolle beträgt die Expression 52 % und in der Aldosteronprobe 59 %. Der Unterschied zur Expression in der Spironolactonkontrolle (53 %) und der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron (26 %) ist signifikant ($p\leq 0,005$).

Für IPP liegt die Expression insgesamt auf einem deutlich höheren Niveau. Den höchsten Wert finden wir erneut in der Corticosteronprobe, hier beträgt die Expression 600 % des Referenzgens. Die Kontrolle weist eine Expression von 400 % auf, aufgrund der hohen Standardabweichung ist der Unterschied zur Aldosteronprobe und zur Spironolactonkontrolle mit jeweils 500 % jedoch nicht signifikant. Auch für IPP liegt die Expression in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron mit 330 % am niedrigsten. Für LIS ist das Expressionsniveau ebenfalls hoch. Die Verteilung auf die einzelnen Proben entspricht dem Muster für Beta-Aktin und IPP, d. h. die Expression ist für Corticosteron am höchsten, hier beträgt der Wert 1600 %. Die Werte der Kontrolle liegen bei 1000 %, bzw. 1100 % bei Vorbehandlung mit Spironolacton. Die Aldosteronprobe ist gegenüber der Kontrolle leicht erhöht, auch hier finden sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,092$). Der Wert für die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron ist mit 800 % am niedrigsten. Für FKBP ist die Expression auf einem niedrigeren Niveau. Hier finden wir die höchsten Werte für die Kontrolle, in der FKBP zu 185 % des Referenzgens exprimiert wird (signifikant gegen alle anderen Proben, $p\leq 0,001$). Die übrigen Proben sind weitgehend auf dem gleichen Niveau exprimiert, der Wert für Aldosteron liegt bei 100 %, in der Corticosteronprobe finden wir 92 % der Expression des Referenzgens. Die Behandlung mit Spironolacton liefert ein Expressionswert von 106 %. Die Proben, in denen nach Vorbehandlung mit Spironolacton Aldosteron zugegeben wurde, zeigen auch hier mit 77 % die niedrigste Expressionrate ($p=0,005$ gegen die Spironolactonkontrolle, $p=0,046$ gegen die Aldosteronprobe). Die Expression von PPIase wiederum ähnelt der von LIS. Sie ist auf einem hohen Niveau, der höchste Wert findet sich für Corticosteron mit 6300 %. Die Kontrolle weist 4800 % der Expression auf und liegt damit unterhalb der Expression in Aldosteron mit 6000 % und der

3. ERGEBNISSE

Spirolactonkontrolle, in der PPIase zu 5300 % exprimiert wird. Auch für diesen Kandidaten ist die Expression in den Kombinationsprobe mit 4300 % am niedrigsten. Die Unterschiede zwischen den Kontrollen und den entsprechenden Steroidproben sind nicht signifikant ($p \leq 0,66$).

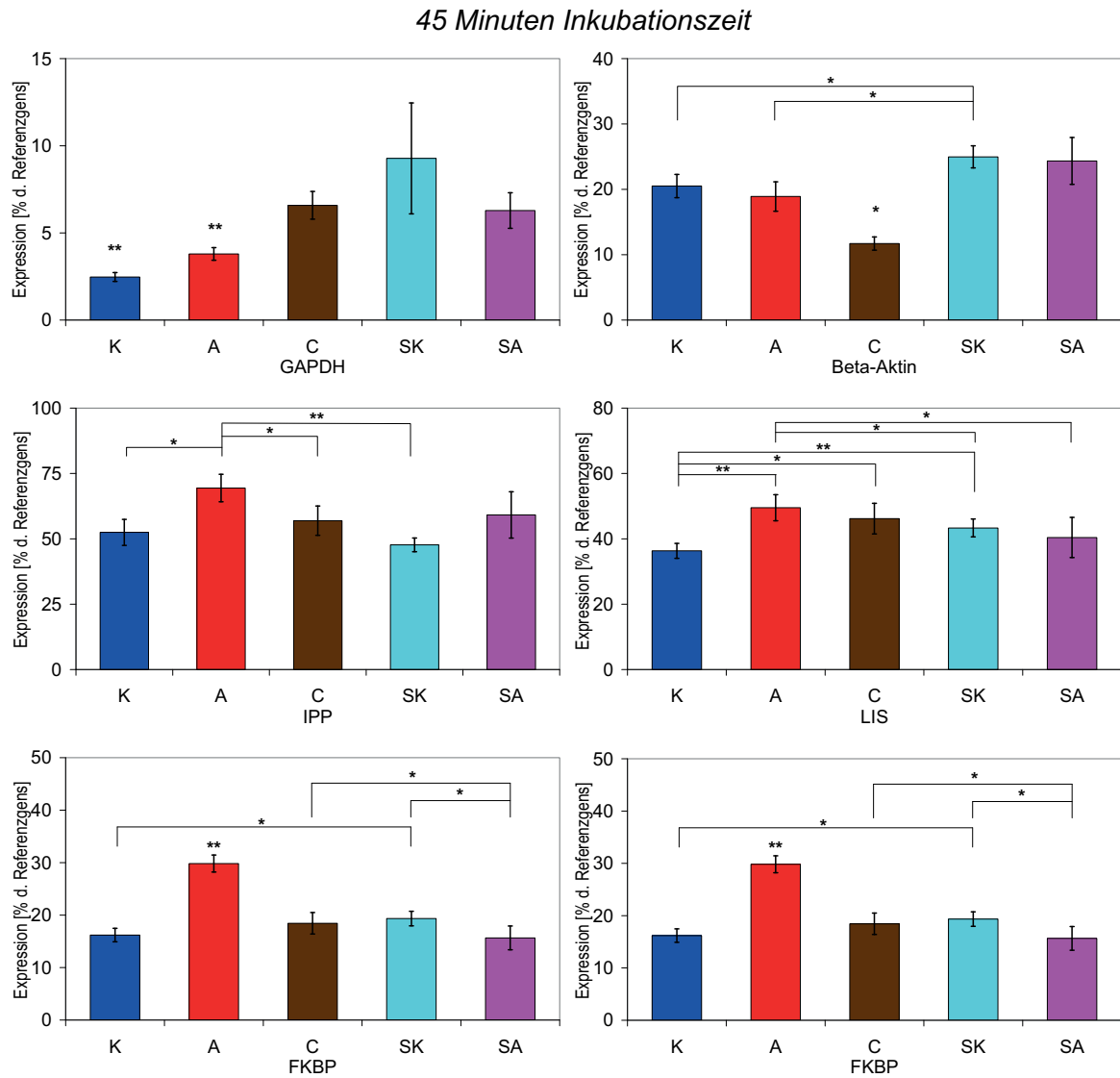


Abb. 3.3.2.2 Expressionsprofile der Kandidaten nach 45 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spirolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spirolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 45 Minuten Inkubationszeit ist die Expression von GAPDH in der Kontrolle noch weiter zurückgegangen, GAPDH wird lediglich zu 2,5 % des Referenzgens exprimiert, damit unterscheidet sich die Kontrolle signifikant von allen anderen Proben ($p \leq 0,008$). Das Niveau der Spirolactonkontrolle ist hingegen gleich geblieben, hier beträgt die Expression 9 %. Für die übrigen Proben sind die Werte leicht gestiegen, in der Aldosteronprobe erfolgt eine

3. ERGEBNISSE

Expression von 3,8 % ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben), Corticosteron liegt mit 6,6 % darüber und auf gleicher Höhe wie die Kombinationsprobe mit 6,3 %. Beta-Aktin wird auf einem deutlich niedrigeren Niveau exprimiert als zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt. Hier finden wir gleiche Werte für Kontrolle und Aldosteron mit 20 bzw. 19 %, sowie für die entsprechenden Spironolactonproben mit 25 bzw. 24 %. In der Corticosteronprobe hingegen ist die Expression mit einem Wert von 12 % signifikant niedriger ($p \leq 0,002$). Für IPP liegt die Expression auf einem deutlich niedrigeren Niveau. Für die Kontrolle beträgt die Expression 52 %, demgegenüber ist die Expression in der Aldosteronprobe mit 70 % erhöht, die Corticosteronprobe hingegen liegt mit 57 % auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle. Die Vorbehandlung mit Spironolacton hat keinen Einfluss auf die Expression, in der Kontrolle beträgt der Expressionswert 48 % des Referenzgens, während in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron eine höhere Expression mit 60 % vorliegt, die nicht signifikant ist ($p = 0,212$). Auch die Expression von LIS liegt auf einem deutlich niedrigeren Niveau als nach 30 Minuten, die Kontrolle zeigt den niedrigsten Wert mit 36 % der Expression. Die übrigen Proben schwanken zwischen Werten von 40 % für die Aldosteronprobe nach Spironolacton, 43 % für die Spironolactonkontrolle, 46 % für die Corticosteronprobe und 50 % für die Aldosteronprobe und liegen somit auf einem Niveau. Für FKBP finden wir nach 45 Minuten eine deutlich erhöhte Expression lediglich in der Aldosteronprobe ($p \leq 0,001$), hier beträgt der Expressionswert 30 % des Referenzgens, während die übrigen Proben auf einem einheitlichen Niveau liegen. Die Kontrolle zeigt 16 %, Corticosteron 18 %, die Spironolactonkontrolle 19 % und die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron 16 % der Expression des Referenzgens. Aufgrund der niedrigen Standardabweichungen ist der Unterschied zwischen der Spironolactonkontrolle und der Kombinationsprobe statistisch signifikant ($p = 0,026$). Die Expression von PPlase wiederum ist in der Kontrolle mit 28 % am niedrigsten. Der Wert in der Aldosteronprobe mit 49 % liegt etwas unter dem in der Corticosteronprobe mit 59 %. Die beiden mit Spironolacton behandelten Proben zeigen wenig Unterschiede: in der Kontrolle beträgt die Expression 59 %, die Behandlung mit Aldosteron nach der Vorbehandlung mit Spironolacton führt zu 54 % Expression.

3. ERGEBNISSE

60 Minuten Inkubationszeit

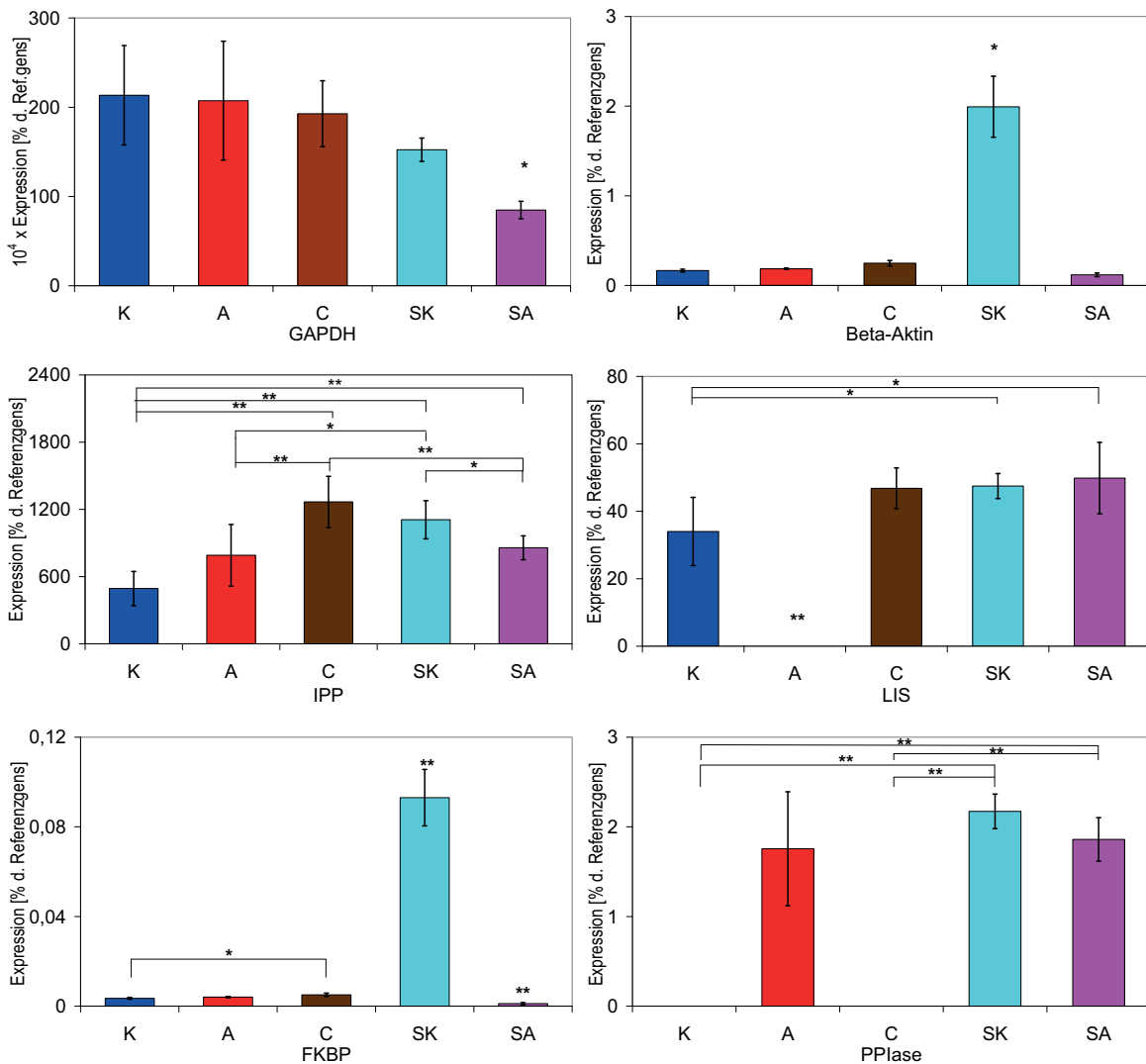


Abb. 3.3.2.3 Expressionsprofile der Kandidaten nach 60 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Die Expression von GAPDH nach 60 Minuten liegt für alle Proben auf einem deutlich höheren Niveau als nach 45 Minuten. Die Kontrolle, die Aldosteronprobe und die Corticosteronprobe zeigen Expression auf einheitlichem Niveau, die Werte liegen um 200.000 % des Referenzgens. Die Spironolactonkontrolle weist einen Wert von 150.000 % auf, in der Aldosteronprobe nach der Vorbehandlung mit Spironolacton findet sich die geringste Expression mit immer noch 80.000 % des Referenzgens ($p \leq 0,001$).

Die Expression von Beta-Aktin ist in der Spironolactonkontrolle mit 2 % signifikant höher als in den restlichen Proben ($p \leq 0,001$), in denen die Expression zwischen 0,1 und 0,24 % des Referenzgens liegt. IPP wird nach 60 Minuten Inkubationszeit wieder stärker exprimiert, die

3. ERGEBNISSE

Kontrolle zeigt mit 500 % die niedrigste Expression, bei der Aldosteronprobe finden wir 790 % Expression, aufgrund der hohen Standardabweichungen liegt jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben vor. Die höchste Expression findet in der Corticosteronprobe mit 1200 % statt, in der Spironolactonkontrolle beträgt der Wert 1100 %, auch zwischen diesen beiden Proben ist aufgrund der Standardabweichungen der Unterschied nicht signifikant. Die Expression in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron beträgt 860 % und liegt somit auf dem gleichen Niveau wie in der Aldosteronprobe ohne die Vorbehandlung mit Spironolacton. Für LIS stellt sich das Expressionsprofil nach 60 Minuten anders dar. Während die Expression in der Kontrolle mit 34 % gegenüber dem vorherigen Zeitpunkt höher liegt, konnte nach 60 Minuten Inkubationszeit keine Expression in den Aldosteronprobe nachgewiesen werden. Die übrigen Proben liegen mit 46 % für Corticosteron bzw. 47 % für die Spironolactonkontrolle und 50 % in der Aldosteronprobe nach Spironolactonvorbehandlung auf einem Niveau ($p \geq 0,998$). FKBP wird auf sehr niedrigem Niveau exprimiert, der höchste Wert findet sich in der Spironolactonkontrolle mit 0,01 % der Expression des Referenzgens ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben). Auch der Wert in der Kombinationsprobe unterscheidet sich mit 0,001 % signifikant von allen Proben. Der Unterschied in der Expression zwischen der Kontrolle (0,01 %) und der Corticosteronprobe (0,03 %) ist ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,027$). Auch das Expressionsprofil von PPlase nach 60 Minuten ist auffällig. Die Expressionswerte liegen sehr niedrig bei 1,7 % für die Aldosteronprobe, auf gleichem Niveau bei 1,9 % für Aldosteron nach der Vorbehandlung mit Spironolacton, und 2,1 % für die Spironolactonkontrolle. Die Expression von PPlase konnte weder für die Corticosteronprobe noch für die Kontrolle nachgewiesen werden.

3. ERGEBNISSE

90 Minuten Inkubationszeit

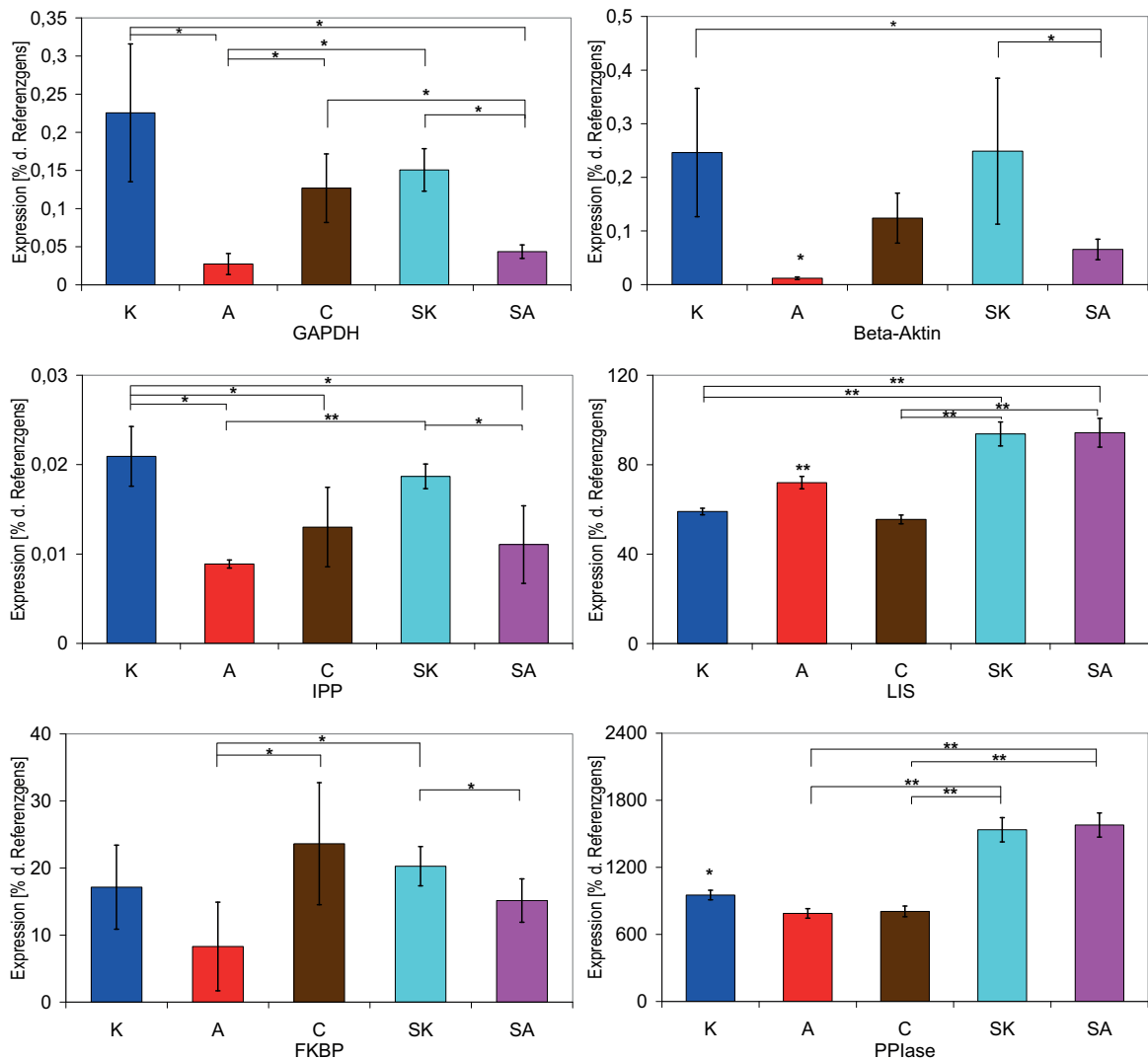


Abb. 3.3.2.4 Expressionsprofile der Kandidaten nach 90 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 90 Minuten Inkubationszeit ist die Expression von GAPDH wiederum sehr niedrig die Kontrolle zeigt mit 0,2 % der Expression den höchsten Wert. Die Werte für Corticosteron mit 0,13 % und für die Spironolactonkontrolle mit 0,15 % liegen auf ungefähr gleichem Niveau wie die Kontrolle ($p \geq 0,12$). Die Werte für beide Aldosteronproben liegen deutlich darunter. In der Aldosteronprobe liegt die Expression bei 0,03 % nach der Vorbehandlung mit Spironolacton beträgt der Wert 0,04 %. Damit unterscheiden sich die Werte für Aldosteron signifikant von den anderen Proben ($p \leq 0,005$). Auch die Expression von Beta-Aktin ist nach 90 Minuten auf einem sehr niedrigen Niveau, die höchsten Werte finden sich für die Kontrollen, sie liegen bei 0,25 % für beide Proben Die Corticosteronprobe weist mit 0,12 % eine niedrigere Expression auf, der Wert liegt aber noch über denen der Aldosteronproben.

3. ERGEBNISSE

Hier finden wir 0,01 % für Aldosteron und 0,06 % für Aldosteron nach der Vorbehandlung mit Spironolacton ($p \leq 0,036$). Auch IPP wird nach 90 Minuten Inkubationszeit auf einem niedrigen Niveau exprimiert. Dabei zeigen die Kontrolle mit jeweils 0,02 % die höchsten Werte. Die Corticosteronprobe liegt mit 0,013 % darunter, am schwächsten exprimiert wird IPP in den Aldosteronproben, hier liegen die Werte bei 0,001 % ($p \leq 0,008$ gegen die Kontrollen). Im Vergleich dazu ist die Expression von LIS nach 90 Minuten deutlich höher. Hier finden sich ähnliche Werte für die Kontrolle (59 %) und Corticosteronprobe (56 %), die Aldosteronprobe liegt mit 72 % etwas darüber ($p \leq 0,001$). Die Vorbehandlung der Zellen mit Spironolacton erhöht die Expression auf einen Wert von 94 %, die Weiterbehandlung mit Aldosteron liefert den gleichen Wert ($p=1$). Ein sehr ähnliches Profil auf einem deutlich höheren Niveau zeigt die Expression von PPlase nach 90 Minuten. Hier liegt die Kontrolle mit 950 % etwas über den Werten für Aldosteron (788 %) und Corticosteron (806 %) ($p \leq 0,03$). Auch für PPlase liegen die Werte für die beiden Spironolactonproben mit 1540 % für die Kontrolle, bzw. 1580 % für die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron auf einem einheitlich hohen Niveau ($p=1$). Die Kontrolle unterscheidet sich mit einem Wert von 950% statistisch signifikant von allen anderen Proben ($p \leq 0,003$). Für FKBP hingegen ergeben sich vergleichbare Werte für die Kontrolle (17 %) und die Spironolactonkontrolle (20 %) ($p=0,988$). In der Corticosteronprobe liegt die Expression bei 24 %, die Aldosteronprobe zeigt die geringste Expression mit 8,3 % ($p=0,88$). In der Kombinationsprobe liegt die Expressionsrate bei 15 % des Referenzgens. Die Standardabweichungen für alle Proben sind hoch. So sind lediglich die Unterschiede zwischen der Aldosteronprobe und der Corticosteronprobe, bzw. der Spironolactonkontrolle statistisch signifikant ($p \leq 0,01$). Auch der Unterschied zwischen der Spironolactonkontrolle und der Kombinationsprobe ist signifikant ($p=0,026$).

3. ERGEBNISSE

120 Minuten Inkubationszeit

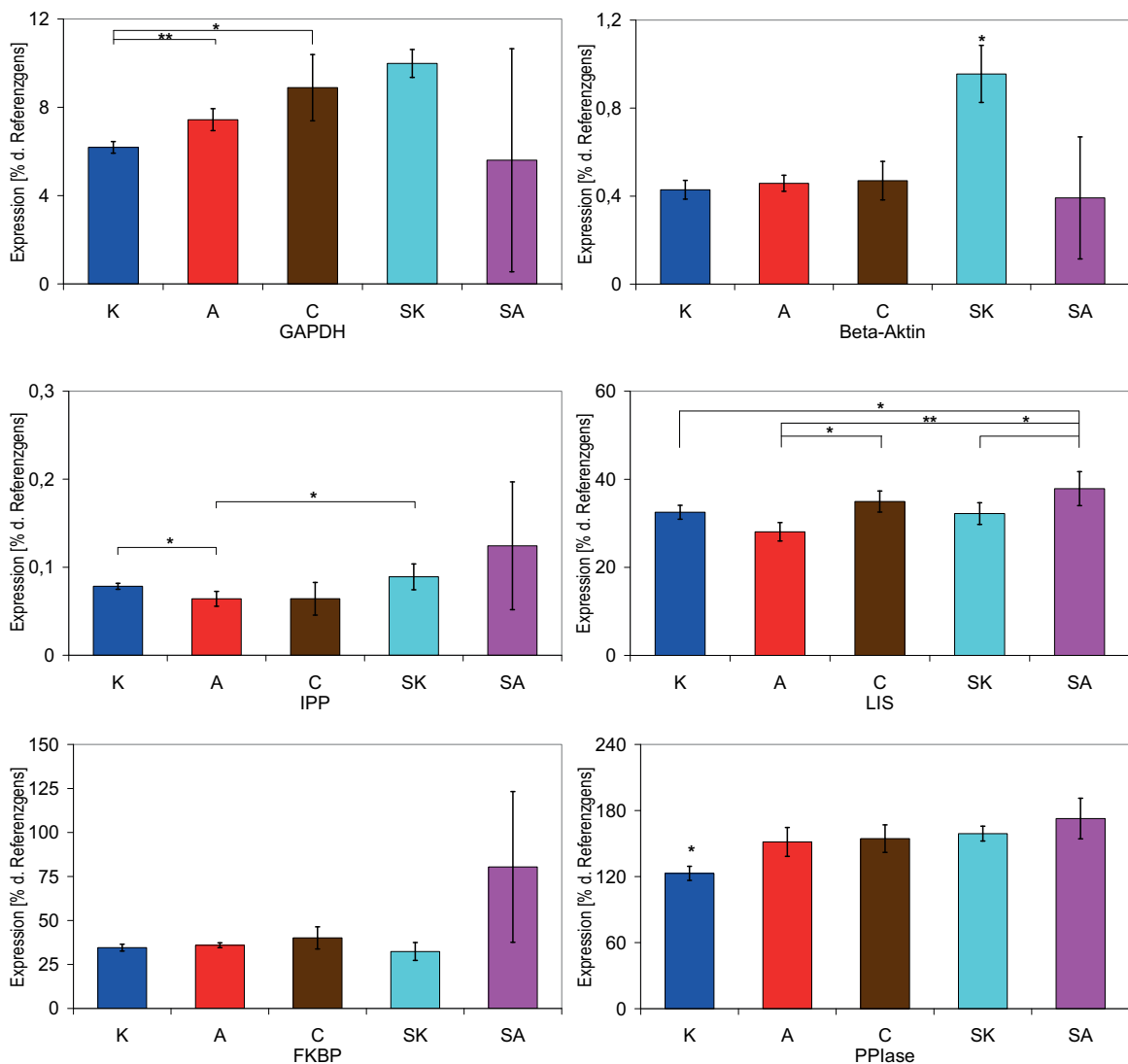


Abb. 3.3.2.5 Expressionsprofile der Kandidaten nach 120 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 120 Minuten Inkubationszeit gibt es für vier der Kandidaten stark schwankende Werte für Aldosteron nach der Vorbehandlung mit Spironolacton. Die Ursache hierfür liegt in stark voneinander abweichenden Einzelwerten für das Referenzgen. Für GAPDH ergibt sich eine Expression auf erneut niedrigem Niveau, die Werte liegen zwischen 6 % in der Kontrolle und 10 % in der Spironolactonkontrolle. Die Corticosteronprobe (9 %) und die Aldosteronprobe (7 %) liegen dazwischen. Nur die Aldosteronprobe nach der Vorbehandlung mit Spironolacton zeigt einen geringeren Mittelwert mit 5,6 %, aufgrund der oben angesprochenen Standardabweichung kann jedoch kein Unterschied zu den anderen Proben bestimmt werden. Somit ist die Kontrolle statistisch signifikant von der

3. ERGEBNISSE

Aldosteronprobe und der Corticosteronprobe ($p \leq 0,006$), für die restlichen Vergleiche ergeben sich keine Signifikanzen. Auch die Expression von Beta-Aktin erfolgt auf niedrigem Niveau, die einzelnen Werte unterscheiden sich bis auf die Spironolactonkontrolle (1 %) nicht voneinander, sie liegen einheitlich bei 0,4 %. Die Spironolactonkontrolle unterscheidet sich somit von allen anderen Proben ($p \leq 0,05$). Auch die Expression von IPP ist niedrig mit geringen Unterschieden zwischen den Proben. Die Werte schwanken zwischen 0,06 % und 0,08 %, der Wert für die Kombinationsprobe fällt mit 0,12 % höher aus, unterscheidet sich aufgrund der Standardabweichung aber nicht von den anderen Proben. Die Expression von LIS erfolgt auf etwas höherem Niveau, hier liegen die Werte zwischen 28 % in der Aldosteronprobe und 38 % für Aldosteron nach der Vorbehandlung mit Spironolacton. Dabei liegt der Wert für die Aldosteronprobe etwas niedriger als für die Kontrolle (32 %), die Spironolactonkontrolle zeigt jedoch einen geringeren Wert (32 %) als die entsprechende Aldosteronprobe. Der Wert in der Corticosteronprobe liegt mit 35 % dazwischen. Die Expression von FKBP liegt für die Werte bis auf die Aldosteronprobe nach Spironolacton einheitlich um 35 %. Die Kombinationsprobe weist einen Mittelwert von 80 % bei einer Standardabweichung von 42 % auf, somit unterscheiden die Proben sich nicht signifikant. Von allen Kandidaten wird PPIase nach 120 Minuten am stärksten exprimiert. Die Kontrolle zeigt eine Expression von 123 % des Referenzgens und liegt damit etwas unterhalb der übrigen Proben ($p \leq 0,004$). Die Behandlung mit Aldosteron (151 %) und Corticosteron (154 %) führt zu ähnlichen Expressionswerten. Die Vorbehandlung mit Spironolacton erhöht die Expression für die Kontrolle auf 160 % und für die Aldosteronprobe auf 172 %. Die Vergleiche zwischen den übrigen Proben liefern damit keine signifikanten Unterschiede.

3. ERGEBNISSE

150 Minuten Inkubationszeit

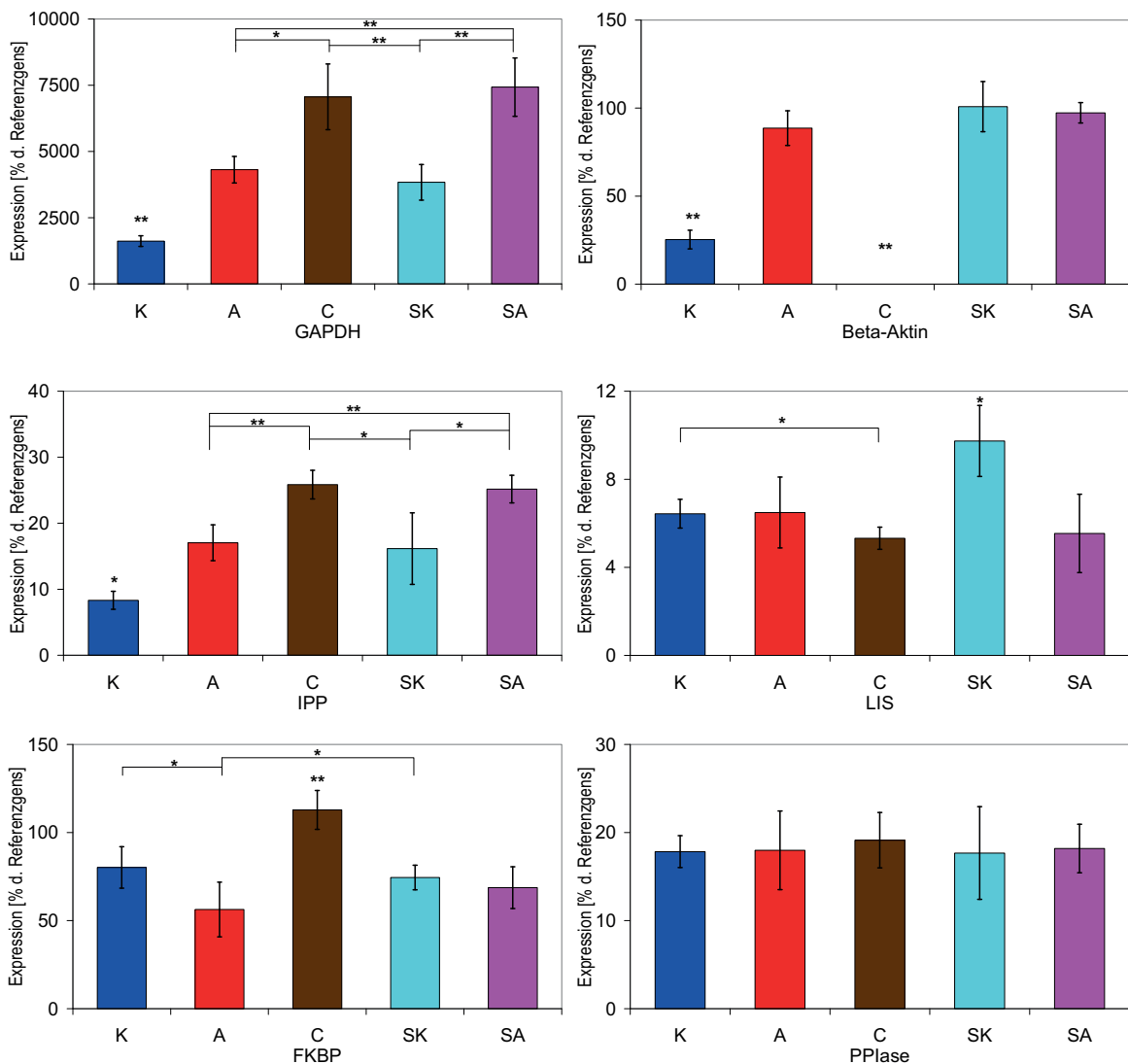


Abb. 3.3.2.6 Expressionsprofile der Kandidaten nach 150 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten ergeben sich die in Abbildung 3.3.2.6 dargestellten Expressionsprofile. Die Expression von GAPDH ist hoch. Der niedrigste Wert findet sich in der Kontrolle (1600 %) ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben), in der Aldosteronprobe beträgt die Expression 4300 % und liegt damit ungefähr auf demselben Niveau wie die Spironolactonkontrolle mit einer Expression von 3800 % ($p = 0,684$). In der Corticosteronprobe liegt die Expression mit 7000 % deutlich höher, ebenso ($p = 0,988$). In der Aldosteronprobe nach der Vorbehandlung mit Spironolacton (7400 %). Die Corticosteronprobe und die Kombinationsprobe unterscheiden sich statistisch signifikant von der Aldosteronprobe und

3. ERGEBNISSE

der Spironolactonkontrolle ($p \leq 0,001$) Die Expression von Beta-Aktin hingegen ist höher als nach 120 Minuten Inkubation, erfolgt aber wesentlich geringer als die Expression von GAPDH. In der Kontrolle liegt der Wert bei 26 % ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben), für Corticosteron konnte keine Expression nachgewiesen werden. In der Aldosteronprobe liegt die Expression bei 88 % des Referenzgens in der Spironolactonkontrolle erfolgt die Expression auf gleichem Niveau wie die des Referenzgens, ebenso in der Aldosteronprobe nach der Vorbehandlung mit Spironolacton (97 %) ($p \geq 0,287$). Das Expressionsprofil für IPP folgt dem Muster des GAPDH, die Expression liegt allerdings insgesamt auf einem niedrigeren Niveau. Der Wert in der Aldosteronprobe (17 %) liegt über dem der Kontrolle (8 %): in der Spironolactonkontrolle (16 %) liegt der Wert höher als in der Kontrolle, ungefähr auf gleichem Niveau wie in der Aldosteronprobe ($p=1$). Die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron weist einen höheren Wert als die Aldosteronprobe auf (25 %), dabei entspricht die Differenz ungefähr der zwischen Spironolactonkontrolle und Kontrolle. Die Expression in der Corticosteronprobe liegt mit 25 % auf dem gleichen Niveau der Kombinationsprobe. Bei der Expression von LIS ergeben sich gleiche Expressionswerte für die Kontrolle und die Aldosteronprobe mit 6 %. Die Expression in der Corticosteronprobe und der Kombinationsprobe liegt etwas darunter (5 %), während die Spironolactonkontrolle mit 9,7 % die höchste Expression zeigt. Die Expression von FKBP ist für alle Proben auf einem höheren Niveau als nach 120 Minuten. In der Corticosteronprobe ist die Expression mit 112 % am höchsten. Für beide Kontrollen ergeben sich ähnliche Werte (80 %, bzw. 74 % für die Kontrolle nach Spironolacton). Die Aldosteronproben liegen etwas darunter (56 %, bzw. 68 % für die Kombinationsprobe). Bei der Expression von PPlase liegen alle Werte auf einem ähnlichen Niveau, sie schwanken zwischen 17 % (Kontrolle, Aldosteron, Spironolactonkontrolle) und 19 % (Corticosteron).

3. ERGEBNISSE

180 Minuten Inkubationszeit

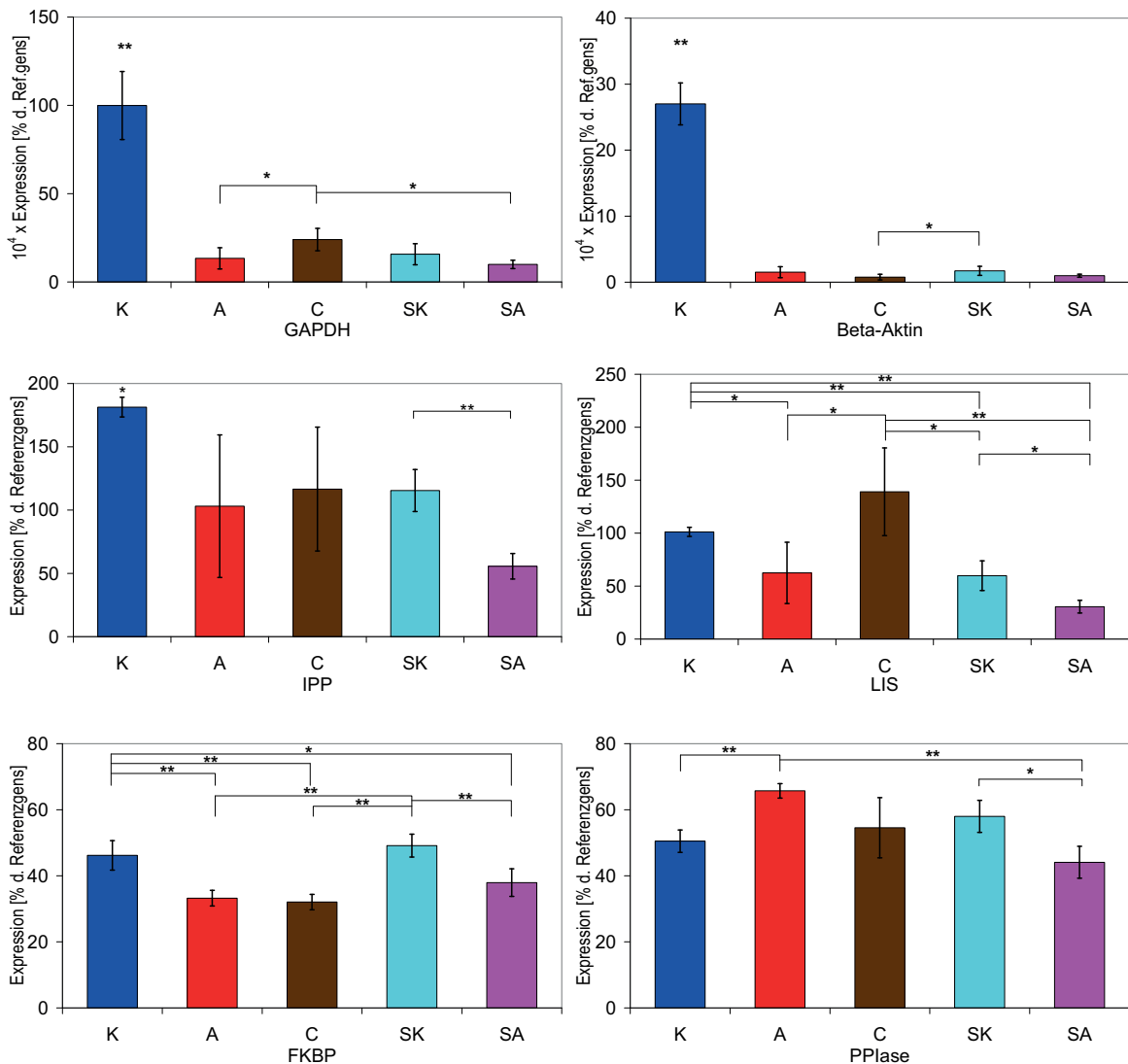


Abb. 3.3.2.7 Expressionsprofile der Kandidaten nach 180 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Die Expression von GAPDH nach 180 Minuten Inkubationszeit liegt deutlich höher als nach 150 Minuten. Dabei zeigt die Kontrolle die mit Abstand höchste Expression. Hier wird der Wert von 100.000 % des Referenzgens erreicht ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben). Die anderen Proben liegen mit Werten zwischen 9000 % und 24.000 % deutlich darunter, aber immer noch auf sehr hohem Niveau. Der Wert für die Corticosteronprobe (24.000 %) liegt etwas höher als der in der Aldosteronprobe (19.000 %) ($p = 0,021$). Die Spironolactonkontrolle zeigt eine etwas geringere Expression als die Aldosteronprobe (15.000 %). Die Kombinationsprobe erreicht mit 10.000 % die niedrigste Expression, ein signifikanter

3. ERGEBNISSE

Unterschied liegt lediglich gegen die Corticosteronprobe vor. Die Expression von Beta-Aktin zeigt ebenso einen viel höheren Wert in der Kontrolle (27.000 %) ($p \leq 0,001$). In der Aldosteronprobe liegt die Expression bei 1500 % des Referenzgens, der Wert für die Corticosteronprobe liegt mit 770 % deutlich darunter, verpasst aber die Signifikanz ($p \geq 0,251$). Die Behandlung mit Spironolacton ergibt in der Kontrolle eine Expression von 1700 % des Referenzgens, in Kombination mit Aldosteron erreicht die Expression von Beta-Aktin einen Wert von 980 %, auch hier ist der Unterschied nicht signifikant ($p = 0,089$). Auch für die Expression von IPP wird der höchste Wert in der Kontrolle (180 %) erreicht, der Unterschied zu den anderen Proben ist geringer als für GAPDH und Beta-Aktin ($p \leq 0,039$). In der Spironolactonkontrolle liegt die Expression mit 115 % deutlich unter der Kontrolle ($p \leq 0,001$). In der Aldosteronprobe beträgt die Expression 103 %, in der Corticosteronprobe 116 %, beide Proben zeigen große Standardabweichungen. In der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron wird mit 55 % des Referenzgens die niedrigste Expression bestimmt ($p \leq 0,001$ gegen beide Kontrollen). Für die Expression von LIS nach 180 Minuten liegt der Wert in der Corticosteronprobe (140 %) am höchsten. In der Kontrolle beträgt die Expression 101 % des Referenzgens, die Spironolactonkontrolle liegt mit einem Wert von 60 % deutlich darunter. Die Expression der Aldosteronprobe beträgt mit 62 % ungefähr genauso viel wie in der Spironolactonkontrolle. Die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron besitzt mit 30 % die geringste Expression von LIS ($p \leq 0,01$ gegen beide Kontrollen). Nach 180 Minuten Inkubationszeit ergeben sich für die Expression von FKBP gleich hohe Werte für die Kontrolle (46 %) und die Spironolactonkontrolle (49 %). Die übrigen Proben zeigen Expressionswerte von 33 % (Aldosteron), 32 % (Corticosteron) und 38 % (Spironolacton und Aldosteron). Hier ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Aldosteronproben gegen beide Kontrollen ($p \leq 0,004$). Für PPlase werden höhere Werte für die Aldosteronprobe (66 %) als für die Kontrolle (50 %) beobachtet. ($p \leq 0,001$) Corticosteron liegt zwischen den beiden Werten (55 %). Die Spironolactonkontrolle zeigt mit 58 % Expression einen höheren Wert als die Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron die Expression niedriger (44 %) als in der Aldosteronprobe ($p \leq 0,001$) und liegt auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle ($p = 0,192$).

3. ERGEBNISSE

210 Minuten Inkubationszeit

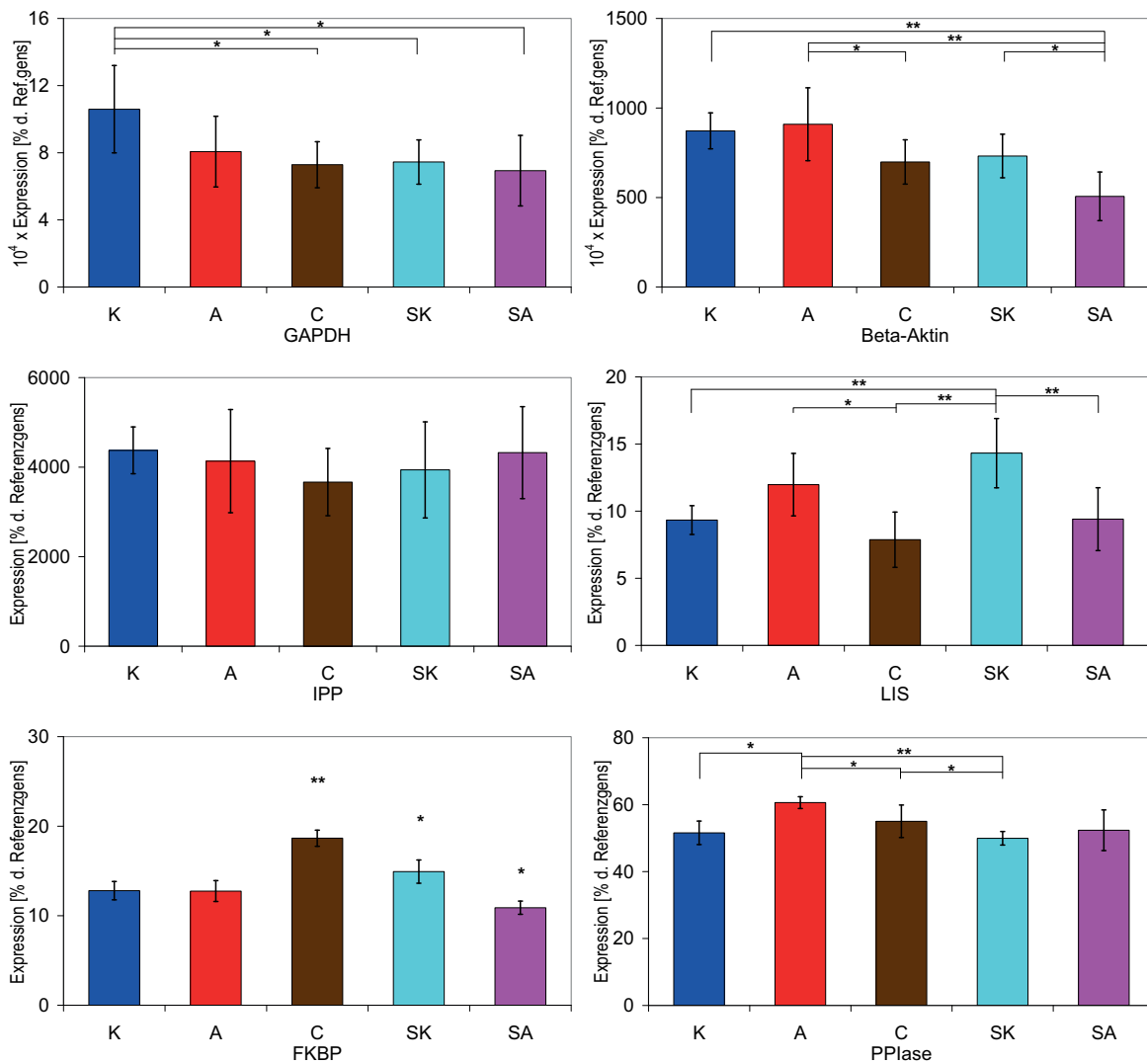


Abb. 3.3.2.8 Expressionsprofile der Kandidaten nach 210 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Nach 210 Minuten Inkubation können im Expressionsprofil von GAPDH fast keine Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden, lediglich die Kontrolle unterscheidet sich von der Corticosteronprobe sowie SA von beiden mit Spironolacton behandelten Proben, nicht jedoch von der Aldosteronprobe. Die Kontrolle weist eine Expression von 10.000 % des Referenzgens auf, die Werte für die anderen Proben liegen etwas niedriger. In der Aldosteronprobe werden 8000 %, in der Corticosteronprobe und in den Spironolacton Proben 7000 % der Expression des Referenzgens erreicht. Für Beta-Aktin liegt die Expression nach 210 Minuten ebenfalls auf einem hohen Niveau. Hier finden sich vergleichbare Werte für die Kontrolle (87.000 %) und die Aldosteronprobe (90.000 %). Die Corticosteronprobe (70.000 %) liegt auf gleichem Niveau wie die Spironolactonkontrolle (73.000 %). Den niedrigsten Wert für

3. ERGEBNISSE

die Expression zeigt die Kombinationsprobe mit 50.000 % ($p \leq 0,002$ gegen alle Proben). Auch für IPP ist die Expression hoch mit geringen Unterschieden zwischen den Proben. Den niedrigsten Wert finden wir in der Corticosteronprobe (3700 %), die Spironolactonkontrolle (3900 %) liegt etwas unter dem Wert in der Kombinationsprobe (4300 %). Die Kontrolle (4400 %) und die Aldosteronprobe (4100 %) liefern vergleichbare Expressionswerte. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben. Im Expressionsprofil von LIS zeigt die Spironolactonkontrolle mit 14 % die höchste Expression. Die Kontrolle liegt bei 9 %, etwas unter der Aldosteronprobe (12 %). Die Kombination von Spironolacton und Aldosteron ergibt ein Expressionswert von 9,4 %, die niedrigste Expression wird in der Corticosteronprobe mit 7,8 % beobachtet. Die statistisch relevanten Unterschiede liegen zwischen den Kontrollen, auch der Unterschied zwischen der Spironolactonkontrolle und der Kombinationsprobe ist statistisch signifikant. Der Vergleich der Aldosteronprobe und der Kontrolle ergibt dagegen keinen signifikanten Unterschied. Die Expression von FKBP ergibt gleiche Werte für die Kontrolle und die Aldosteronprobe (12 %), die Corticosteronprobe (18 %) und die Spironolactonkontrolle (15 %) liegen etwas höher, die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron hingegen darunter (11 %). Die Expression von PPIase ist höher als die des FKBP. Der Wert für die Aldosteronprobe ist mit 60 % etwas höher als der der Kontrolle (52 %) ($p \leq 0,006$). Der Wert für die Spironolactonkontrolle liegt nahe an dem der Kontrolle (50 %), demgegenüber ist die Kombinationsprobe leicht erhöht (52 %), der Unterschied ist nicht statistisch signifikant. Der Expressionswert für die Corticosteronprobe liegt mit 55 % zwischen denen der Kontrolle und der Aldosteronprobe, die Corticosteronprobe unterscheidet sich statistisch signifikant von der Spironolactonkontrolle ($p=0,022$) und der Aldosteronprobe ($p=0,002$).

3. ERGEBNISSE

240 Minuten Inkubationszeit

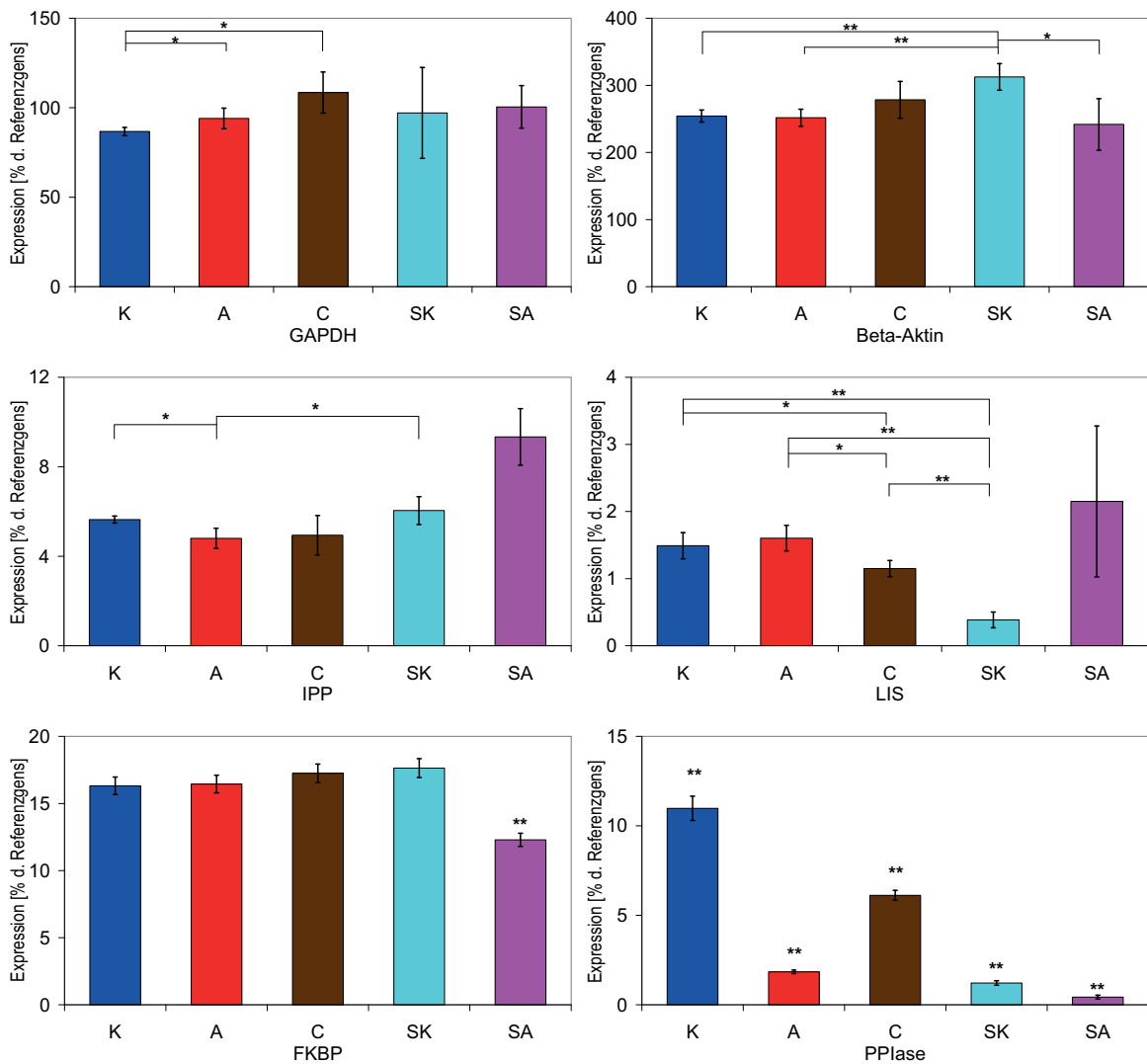


Abb. 3.3.2.9 Expressionsprofile der Kandidaten nach 240 Minuten Inkubationszeit in HL-1 Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$

Auch nach 240 Minuten können im Expressionsprofil von GAPDH kaum Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden. In den Kontrollen beträgt die Expression 86 % des Referenzgens, die Spironolactonkontrolle weist einen Wert von 97 % auf. Der Wert der Aldosteronprobe ist mit 94 % etwas höher als der der Kontrolle ($p=0,048$), ebenso ist der Wert der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron mit 100 % etwas höher als der der Spironolactonkontrolle (nicht signifikant). Die Corticosteronprobe zeigt mit 108 % die höchste Expression, auch hier ist der Unterschied zur Kontrolle signifikant ($p=0,004$). Die Expressionswerte für Beta-Aktin liegen für die Kontrolle (254 %), die Aldosteronprobe

3. ERGEBNISSE

(251 %), und die Kombinationsprobe (241 %) in der gleichen Größenordnung. Die Expressionwerte in der Corticosteronprobe (278 %) und der Spironolactonkontrolle (312 %) liegen etwas höher. Die Spironolactonkontrolle unterscheidet sich dabei statistisch signifikant von der Kontrolle, der Aldosteronprobe und der Kombinationsprobe ($p \leq 0,004$). Bei der Expression von IPP fällt der Wert in der Kombinationsprobe mit 9 % etwas höher aus als die anderen Werte, die zwischen 5 % und 6 % liegen, zwischen der Kontrolle und der Aldosteronprobe ist der Unterschied signifikant ($p = 0,004$), wobei die Expression in der Aldosteronprobe einigen niedrigeren Wert aufweist als in der Kontrolle. Bei der Expression von LIS zeigt die Spironolactonkontrolle mit 0,4% der Expression des Referenzgens den geringsten Wert, außer von der Kombinationsprobe unterscheidet sich dieser Wert signifikant von den anderen Proben ($p \leq 0,001$). Auch die Corticosteronprobe zeigt statistisch signifiante Unterschiede zur Kontrolle, der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle ($p \leq 0,023$). Die Expression von FKBP liegt für die Kontrolle und die Aldosteronprobe bei 16 %, die Corticosteronprobe (17 %) liegt gleich hoch wie die Spironolactonkontrolle, die Kombinationsprobe liefert eine etwas geringere Expression (12 %), lediglich der Unterschied der Kombinationsprobe zu den anderen Proben ist signifikant ($p \leq 0,001$).

Im Expressionsprofil von PPlase zeigt die Kontrolle mit 11 % des Referenzgens die höchste Expression ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben). Die Corticosteronprobe weist 6 % Expression auf. Der Wert in der Aldosteronprobe liegt mit 1,8% noch über der Spironolactonkontrolle (1,2 %) und der Kombinationsprobe (0,43 %), damit unterscheiden sich alle Werte signifikant von jeweils allen anderen Proben.

3.3.3 Expression in HCT 116 Zellen

Da zu den HCT116 Zellen keine Angaben zur Anzahl der Passagen existierten, wurden die Zellen für ein Experiment durch Splitten aus jeweils der gleichen Schale verwendet. Für RT-PCR Experimente wurden Triplikate eingesetzt, zur Normalisierung wurden die erhaltenen Einzelwerte durch die Einzelwerte des Referenzgens rps27 dividiert, die erhaltenen 9 Einzelwerte wurden als eine Gruppe betrachtet und zur statistischen Auswertung (ANOVA und paarweise Vergleiche) eingesetzt. In den Abbildungen sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung in Relation zum Referenzgen dargestellt.

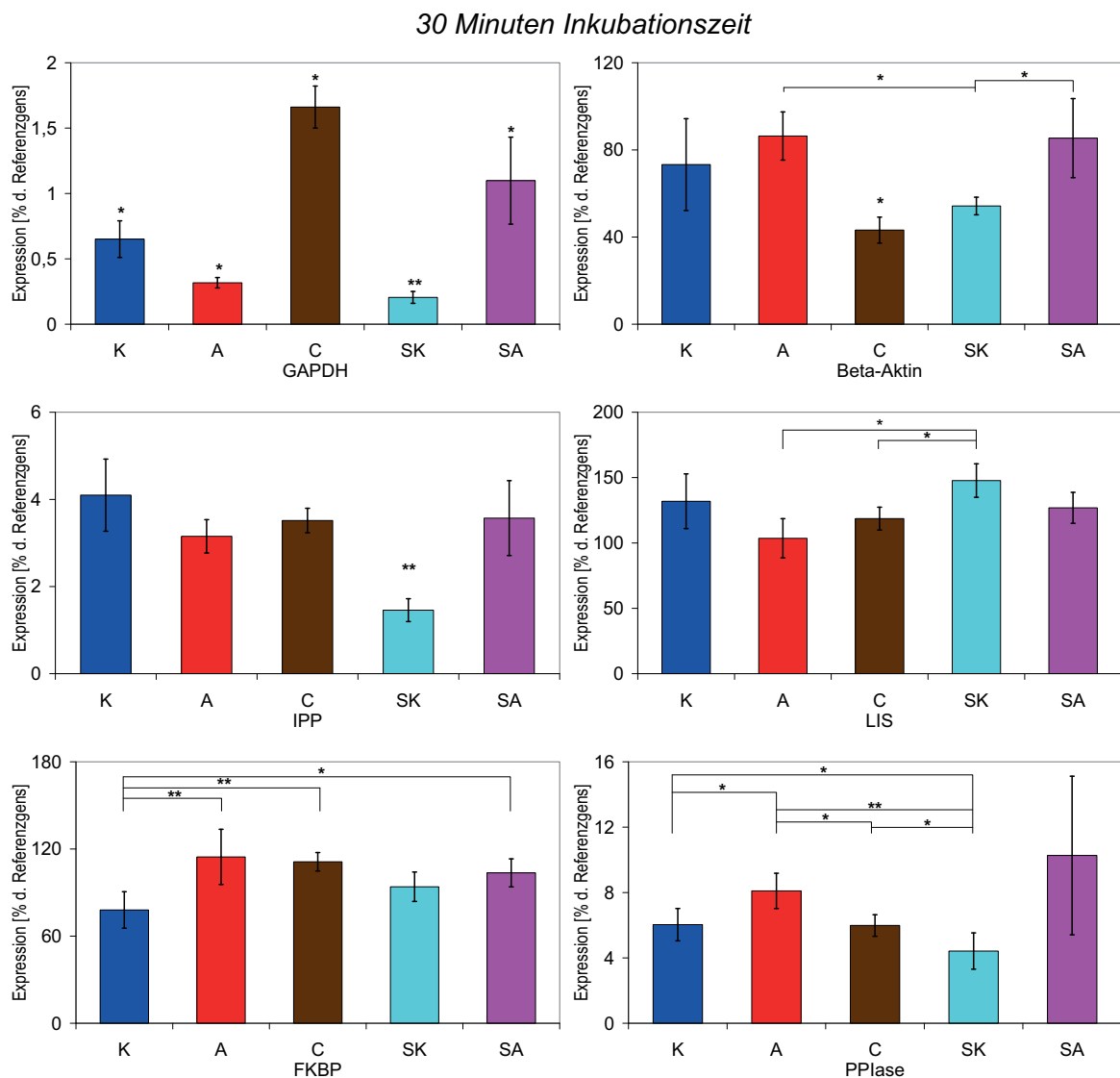


Abb. 3.3.3.1 Expressionsprofile der Kandidaten nach 30 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

3. ERGEBNISSE

Auch in den HCT Zellen zeigen sich erste Unterschiede im Expressionsprofil nach 30 Minuten. Für GAPDH ist die Expression auf einem niedrigen Niveau. In der Kontrolle finden sich 0,6% im Vergleich zum Referenzgen. In der Spironolactonkontrolle liegt der Expressionswert mit 0,2% noch niedriger ($p \leq 0,001$). Die Aldosteronprobe zeigt 0,3% Expression, die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron ist dagegen mit 1% Expression leicht erhöht, beide Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle ($p \leq 0,035$). Der höchste Wert in die Expression von GAPDH liegt in der Corticosteronprobe vor (1,6%), diese Probe unterscheidet sich somit von allen anderen ($p \leq 0,07$). Im Vergleich zu GAPDH ist die Expression von Beta-Aktin stärker ausgeprägt. In der Kontrolle finden sich 73%, in der Spironolactonkontrolle 54% Expression im Vergleich zum Referenzgen. Die Werte in den Aldosteronproben liegen jeweils etwas höher: Aldosteron zeigt 86% Expression, in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron finden sich ebenfalls 86%, damit ist der Unterschied zur Spironolactonprobe signifikant ($p \leq 0,008$), während keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle vorliegen ($p \geq 0,734$). In der Corticosteronprobe liegt die Expression für Beta-Aktin mit einem Wert von 43% am niedrigsten, der Unterschied ist zu allen anderen Proben signifikant ($p \leq 0,024$). Die Expression von IPP liegt auf einem niedrigen Niveau, in der Kontrolle beträgt die Expression 4%, die Spironolactonkontrolle liegt mit 1,5% darunter, sie unterscheidet sich als einzige der Proben signifikant von den Übrigen ($p \leq 0,001$). Der Wert für die Aldosteronprobe beträgt 3%, in der Kombinationsprobe liegt die Expression mit 3,6% auf dem gleichen Niveau. Auch in der Corticosteronprobe liegt die Expression bei 3,5%.

LIS wiederum ist verhältnismäßig hoch exprimiert, in der Kontrolle beträgt der Wert 132% des Referenzgens. Die Spironolactonkontrolle ist im Vergleich dazu mit 148% leicht erhöht ($p=1$). In der Aldosteronprobe liegt die Expression mit 104% unter dem Wert der Kontrolle, analog dazu liegt die Expression in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron bei 127%, die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ($p \geq 0,141$). Die Expression von LIS in der Corticosteronprobe liegt mit 118% zwischen den Werten von Aldosteron und der Kontrolle.

Für FKBP beträgt der Wert in der Kontrolle 78%, demgegenüber ist die Expression in der Aldosteronprobe mit 115% erhöht ($p \leq 0,001$). Der Wert für Corticosteron liegt mit 111% vergleichbar hoch. Die Spironolactonkontrolle zeigt mit 94% Expression einen höheren Wert als die Kontrolle, in der Kombinationsprobe dagegen liegt der Wert mit 104% unter dem der Aldosteronprobe, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant davon ($p=1$). PPlase ist niedriger exprimiert als FKBP. Die Kontrolle zeigt 6% Expression im Vergleich zum Referenzgen. In der Aldosteronprobe liegt die Expression mit 8% etwas höher ($p=0,006$), Corticosteron liegt bei 6% auf gleichem Niveau wie die Kontrolle. Die Behandlung mit Spironolacton erniedrigt in der Kontrolle die Expression auf einen Wert von 4,4% ($p=0,05$). In der Kombinationsprobe

3. ERGEBNISSE

liegt der Expressionswert dagegen mit 10 % über dem der Aldosteronprobe, verfehlt jedoch die Signifikanz ($p \geq 0,054$).

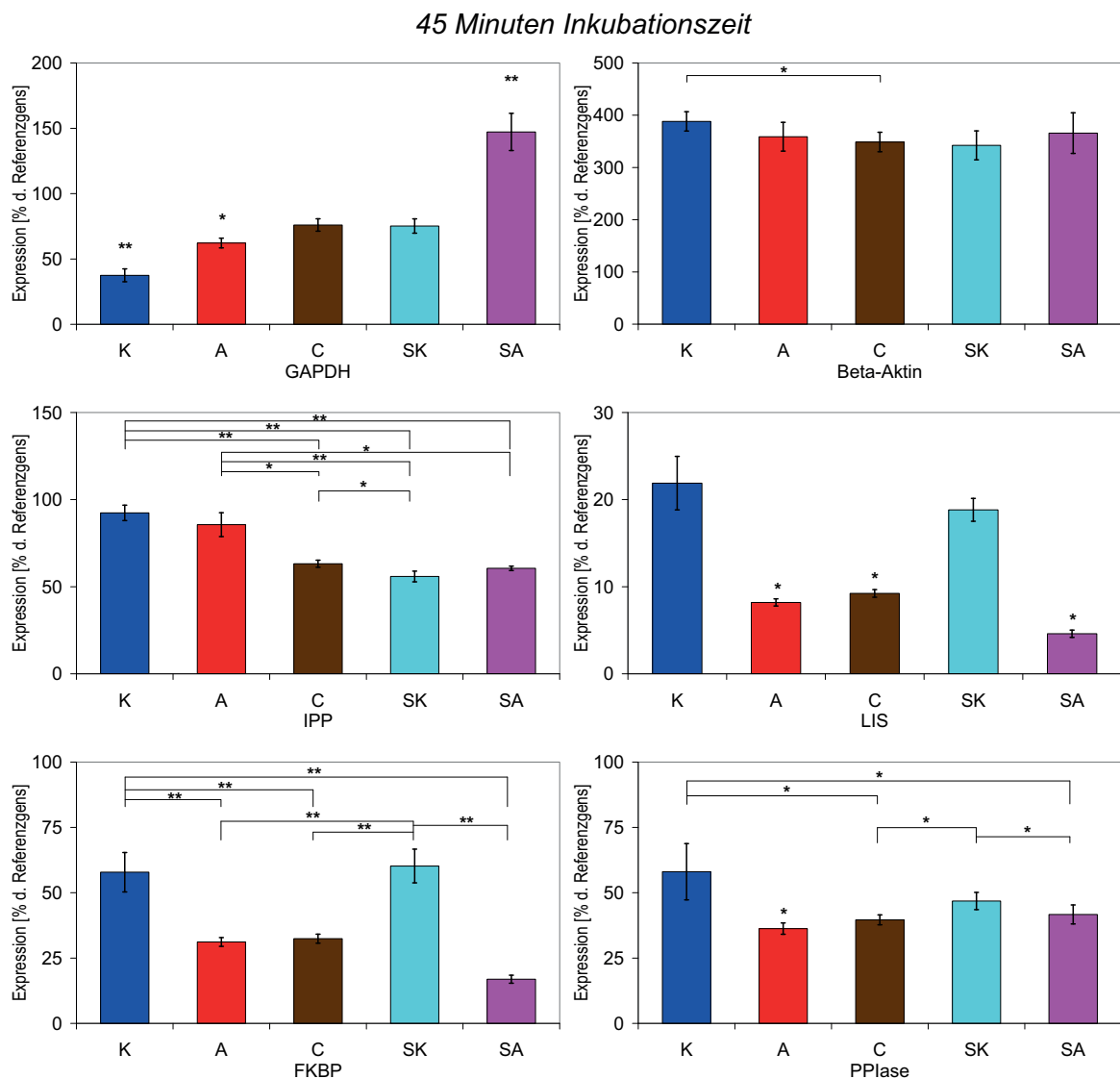


Abb. 3.3.3.2 Expressionsprofile der Kandidaten nach 45 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 45 Minuten Inkubation ist die Expression von GAPDH auf einem etwas höheren Niveau als nach 30 Minuten. In der Kontrolle beträgt die Expression 38 % im Vergleich zum Referenzgen. Aldosteron liegt mit einem Wert von 62 % höher als die Kontrolle, das gleiche gilt für Corticosteron mit einer Expression von 76 % ($p \leq 0,001$). Auch in der Spironolactonkontrolle liegt die Expression bei 75 %. In der Kombinationsprobe liegt die Expression von GAPDH nach 45 Minuten mit 147 % am höchsten ($p \leq 0,001$). Auch die Expression von Beta-Aktin liegt höher als nach 30 Minuten. Alle Proben liegen ungefähr auf 90

3. ERGEBNISSE

dem gleichen Niveau, die Werte variieren zwischen 342 % in der Spironolactonkontrolle und 388 % in der Kontrolle, die Unterschiede zwischen den Proben sind nicht statistisch signifikant, bereits im ANOVA-Test werden mit einem p -Wert von 0,65 einheitliche Mittelwerte bestätigt, lediglich zwischen der Kontrolle und der Corticosteronprobe liegt ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,041$). IPP wird ebenfalls stärker exprimiert, hier liegen die Kontrolle (92 %) und die Aldosteronprobe (85 %) auf einem Niveau. In der Corticosteronprobe liegt die Expression mit 63 % niedriger. In der Spironolactonkontrolle beträgt der Wert 56 %, in der Kombinationsprobe 60 %, dabei ergeben sich verschiedene statistisch signifikante Unterschiede, jedoch nicht zwischen der Kontrolle und der Aldosteronprobe, bzw. der Spironolactonkontrolle und der Kombinationsprobe. Die Expression von LIS liegt nach 45 Minuten auf einem niedrigeren Niveau als nach 30 Minuten, die Kontrolle zeigt die höchsten Expressionswerte mit 22 % im Vergleich zum Referenzgen ($p\leq 0,001$ gegen die Steroidproben), die Spironolactonkontrolle liegt mit 19 % etwas darunter. Die Expression in der Aldosteron- und der Corticosteronprobe unterscheidet sich mit Werten von 8,2 bzw. 9,2 % des Referenzgens statistisch nicht voneinander ($p=1$). In der Kombinationsprobe ist der Wert mit 4,6 % statistisch signifikant unterschiedlich von allen anderen Proben ($p\leq 0,001$). Die Expression von FKBP liegt nach 45 Minuten auf einem niedrigeren Niveau als nach 30 Minuten. Die Kontrolle zeigt 58 % der Expression des Referenzgens, die Spironolactonkontrolle liegt mit 60 % auf gleicher Höhe ($p=0,3$). Die Steroidproben zeigen durchgängig eine Expression auf niedrigerem Niveau ($p\geq 0,887$ zwischen den Steroidproben und $p\leq 0,001$ gegen die Kontrollen) als die Kontrollen. In der Aldosteronprobe finden sich 31 % und in der Corticosteronprobe 32 %, die Kombinationsprobe liegt mit einem Wert von 17 % am niedrigsten. Die Expression von PPlase beträgt in der Kontrolle 58 %, der Wert für die Spironolactonkontrolle ist mit 47 % etwas darunter ($p=0,817$). Die Steroidproben liegen hier auf dem gleichen Niveau. Der Wert für Aldosteron beträgt 36 %, Corticosteron weist 39 % Expression auf, der Wert für die Kombinationsprobe liegt mit 42 % etwas höher, der Unterschied zu den Kontrollen ist signifikant ($p\leq 0,016$).

3. ERGEBNISSE

60 Minuten Inkubationszeit

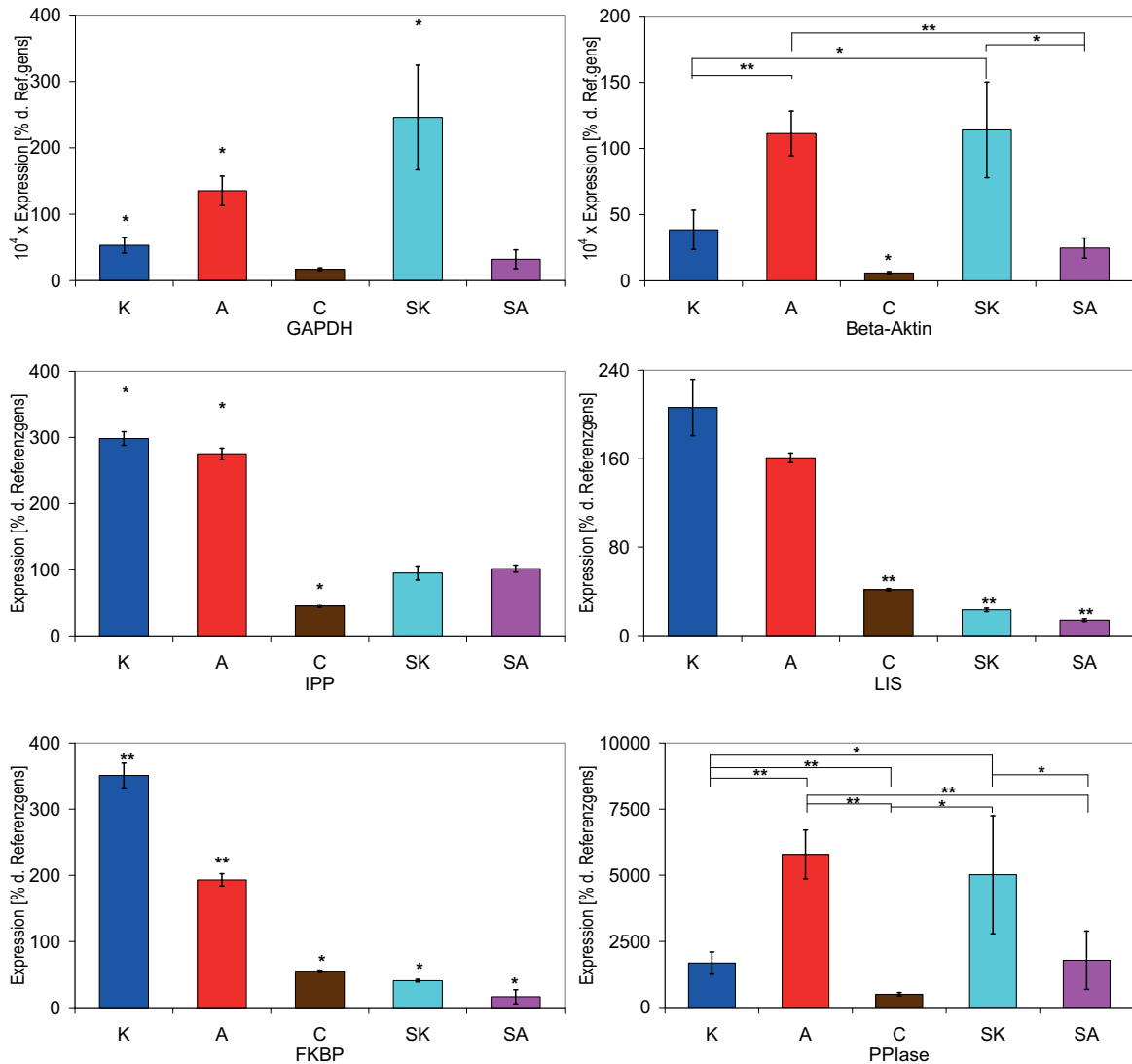


Abb. 3.3.3.3 Expressionsprofile der Kandidaten nach 60 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 60 Minuten Inkubation ergibt sich ein vollkommen anderes Bild als nach 30 Minuten. Für alle Kandidaten gibt es große Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Proben, die Muster unterscheiden sich dabei stark. Die Expression von GAPDH liegt in allen Proben wesentlich höher als nach 45 Minuten. In der Kontrolle beträgt der Wert $5,3 \times 10^4 \%$. Die Aldosteronprobe liegt mit $13,5 \times 10^4 \%$ deutlich darüber ($p \leq 0,001$). Die Spironolactonkontrolle zeigt mit $25 \times 10^4 \%$ die mit Abstand höchste Expression, allerdings ist die Standardabweichung extrem hoch ($7,8 \times 10^4 \%$). Die Kombinationsprobe zeigt mit $3,2 \times 10^4 \%$ eine Expression auf deutlich niedrigerem Niveau als in der Aldosteronprobe

3. ERGEBNISSE

($p \leq 0,001$). Der Wert für Corticosteron liegt mit $1,78 \times 10^4 \%$ am niedrigsten von allen ($p=0,096$ gegen die Kombinationsprobe, $p \leq 0,001$ für alle anderen Vergleiche). Auch die Expression von Beta-Aktin ist nach 60 Minuten auf einem hohen Niveau. Das Verteilungsmuster innerhalb der Proben entspricht dem der GAPDH, die Höhe der einzelnen Proben variiert dabei aber etwas. Die Kontrolle zeigt $38 \times 10^4 \%$ Expression, in der Aldosteronprobe finden sich $110 \times 10^4 \%$ Expression, sie liegt damit ungefähr auf gleichem Niveau wie die Spironolactonkontrolle ($114 \times 10^4 \%$). In der Kombinationsprobe wird Beta-Aktin zu $25 \times 10^4 \%$ exprimiert und liegt auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle. Der Wert für Corticosteron liegt, wie in allen Kandidaten nach 60 Minuten Inkubation, mit $5,9 \times 10^4 \%$ am niedrigsten. Auch die Expression von IPP ist nach 60 Minuten auf einem hohen Niveau. In der Kontrolle beträgt die Expression 1000 %, dieser Wert liegt etwas unter der Spironolactonkontrolle mit 1200 %. In der Aldosteronprobe liegt die Expression mit 1800 % deutlich über der Kontrolle ($p \leq 0,001$), die Kombinationsprobe dagegen liegt mit 470 % unter dem Wert der Spironolactonkontrolle ($p=0,01$). Auch hier finden sich für Corticosteron die niedrigsten Werte mit 260 %. Die Verteilung der Expression für LIS stellt sich vollkommen anders dar. Den höchsten Wert der Expression zeigt hier mit 206 % die Kontrolle, in der Aldosteronprobe ist der Wert auf 160 % abgesenkt (nicht signifikant, $p=0,092$). Die Spironolactonkontrolle liegt auf einem wesentlich niedrigeren Niveau bei 23 % Expression ($p \leq 0,001$), in der Kombinationsprobe liegt die Expression mit 14 % noch darunter ($p \leq 0,001$). Die Expression in der Corticosteronprobe liegt mit 42 % über den mit Spironolacton behandelten Proben. Auch FKBP und PPIase sind nach 60 Minuten Inkubationszeit höher exprimiert. Für FKBP ergibt sich ein ähnliches Bild wie für LIS. Die Kontrolle zeigt mit 350 % Expression den höchsten Wert, die Aldosteronprobe liegt mit 193 % darunter ($p \leq 0,001$), die Corticosteronprobe (55 %) noch niedriger. Die Spironolactonkontrolle liegt bei 50 % Expression ($p=0,01$ gegen die Kontrolle), die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron mit 16 % Expression deutlich darunter ($p \leq 0,001$). Bei der Expression von PPIase liegen die Werte in der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle am höchsten, und zwar auf einem vergleichbaren Niveau bei 5800 % (Aldosteron), bzw. bei 5000 % (Spironolactonkontrolle) ($p=0,989$). Die Kontrolle liegt mit 1700 % deutlich darunter, ebenso wie die Kombinationsprobe mit 1800 % ($p=1$ zwischen den beiden Proben, bzw. $p \leq 0,022$ gegen die Aldosteronprobe und die Spironolactonkontrolle). In der Corticosteronprobe liegt die Expression mit 500 % des Referenzgens am niedrigsten

3. ERGEBNISSE

90 Minuten Inkubationszeit

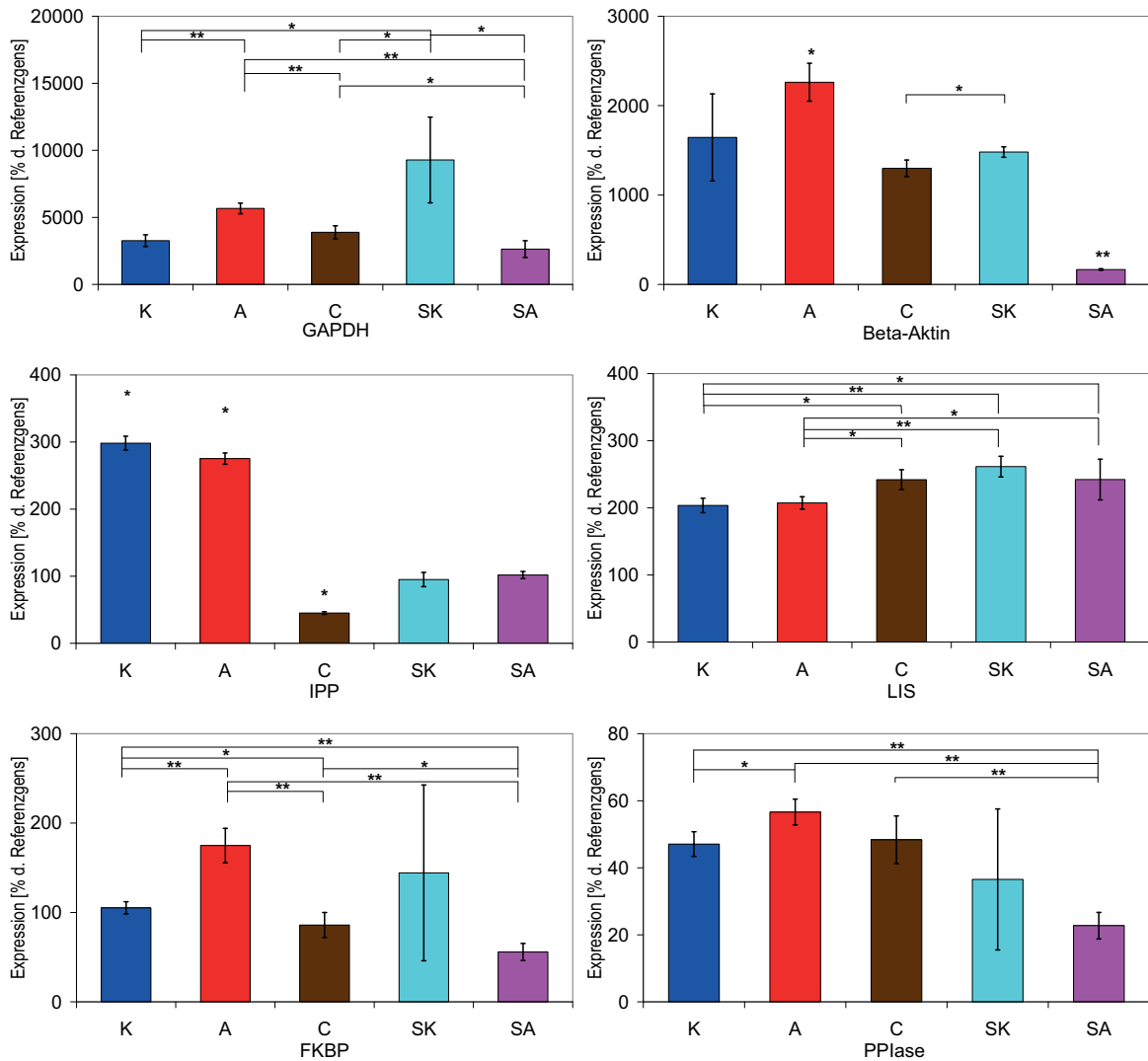


Abb. 3.3.3.4 Expressionsprofile der Kandidaten nach 90 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 90 Minuten Inkubation liegt die Expression von GAPDH niedriger als nach 60 Minuten, es finden sich in der Kontrolle 3200 % der Expression des Referenzgens. In der Aldosteronprobe liegt die Expression mit 5600 % deutlich darüber ($p \leq 0,001$). Auch Corticosteron zeigt mit 3900 % Expression einen höheren Wert als die Kontrolle, wobei sich der Wert jedoch von der Kontrolle nicht statistisch signifikant unterscheidet ($p = 0,209$). In der Spironolactonkontrolle beträgt die Expression von GAPDH 9300 %, damit unterscheidet sich die Spironolactonkontrolle statistisch nicht signifikant von der Aldosteronprobe ($p = 0,073$), jedoch von allen anderen Proben. In der Kombinationsprobe aus Spironolacton und

3. ERGEBNISSE

Aldosteron liegt die Expression mit 2600 % am niedrigsten, dieser Wert ist nicht signifikant verschieden von der Kontrolle, jedoch von den anderen Proben. Auch für die Expression von Beta Aktin liegt die Expression in der Kombinationsprobe am niedrigsten (166 %) ($p \leq 0,001$). In der Aldosteronprobe ist die Expression mit 2200 % im Vergleich zum Referenzgen am höchsten, die übrigen Werte liegen relativ nah beieinander, sie betragen 1600 % für die Kontrolle ($p = 0,044$ gegen Aldosteron), 1300 % für die Corticosteronprobe und 1500 % für die Spironolactonkontrolle. Die Expression von IPP ist nach 90 Minuten niedriger als nach 60 Minuten. In der Kontrolle liegt die Expression bei 300 %, in der Aldosteronprobe bei 275 %. Damit unterscheiden sich die beiden Werte signifikant ($p \leq 0,018$). Die Spironolactonkontrolle zeigt eine deutlich geringere Expression bei 95 % und liegt auf dem gleichen Niveau ($p = 0,807$) wie die Kombinationsprobe mit 101 %. In der Corticosteronprobe ist die Expression von IPP nach 90 Minuten mit 45 % am niedrigsten ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben). Die Expression von LIS zeigt für die Kontrolle mit 203 % einen Wert, der sich von dem nach 60 Minuten kaum unterscheidet. Die Aldosteronprobe liegt bei 207 %, in der Corticosteronprobe finden sich 241 %. Die Spironolactonproben liegen etwas höher, in der Kontrolle 260 %, die Kombinationsprobe zeigt 242 % Expression. Damit unterscheidet sich die Aldosteronprobe nicht signifikant von der Kontrolle, bzw. die Kombinationsprobe nicht von der Spironolactonkontrolle ($p \geq 0,561$). Die Expression von FKBP liegt auf einem niedrigeren Niveau als nach 60 Minuten. In der Kontrolle beträgt der Wert 105 %, demgegenüber ist die Expression in den Aldosteronproben mit 175 % erhöht ($p \leq 0,001$). Die Expression von Corticosteron liegt mit 86 % unterhalb der Expression der Kontrolle. In der Spironolactonkontrolle beträgt die Expression 144 %, die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron liegt mit 56 % darunter, unterscheidet sich jedoch aufgrund der großen Standardabweichung in der Spironolactonkontrolle nicht signifikant davon. Die Expression von PPlase liegt nach 90 Minuten sehr viel niedriger als nach 60 Minuten. In der Kontrolle beträgt die Expression 47 %, damit liegt die Kontrolle auf gleicher Höhe wie Corticosteron (48 %). In der Aldosteronprobe ist die Expression mit 56 % leicht erhöht ($p = 0,001$), die Spironolactonkontrolle liegt mit 36 % unter der Expression der Kontrolle, die Kombinationsprobe zeigt mit 23 % Expression den geringsten Wert, verpasst aber wie im Falle des FKBP wegen der großen Standardabweichung in der Spironolactonkontrolle die Signifikanz ($p = 0,597$).

3. ERGEBNISSE

120 Minuten Inkubationszeit

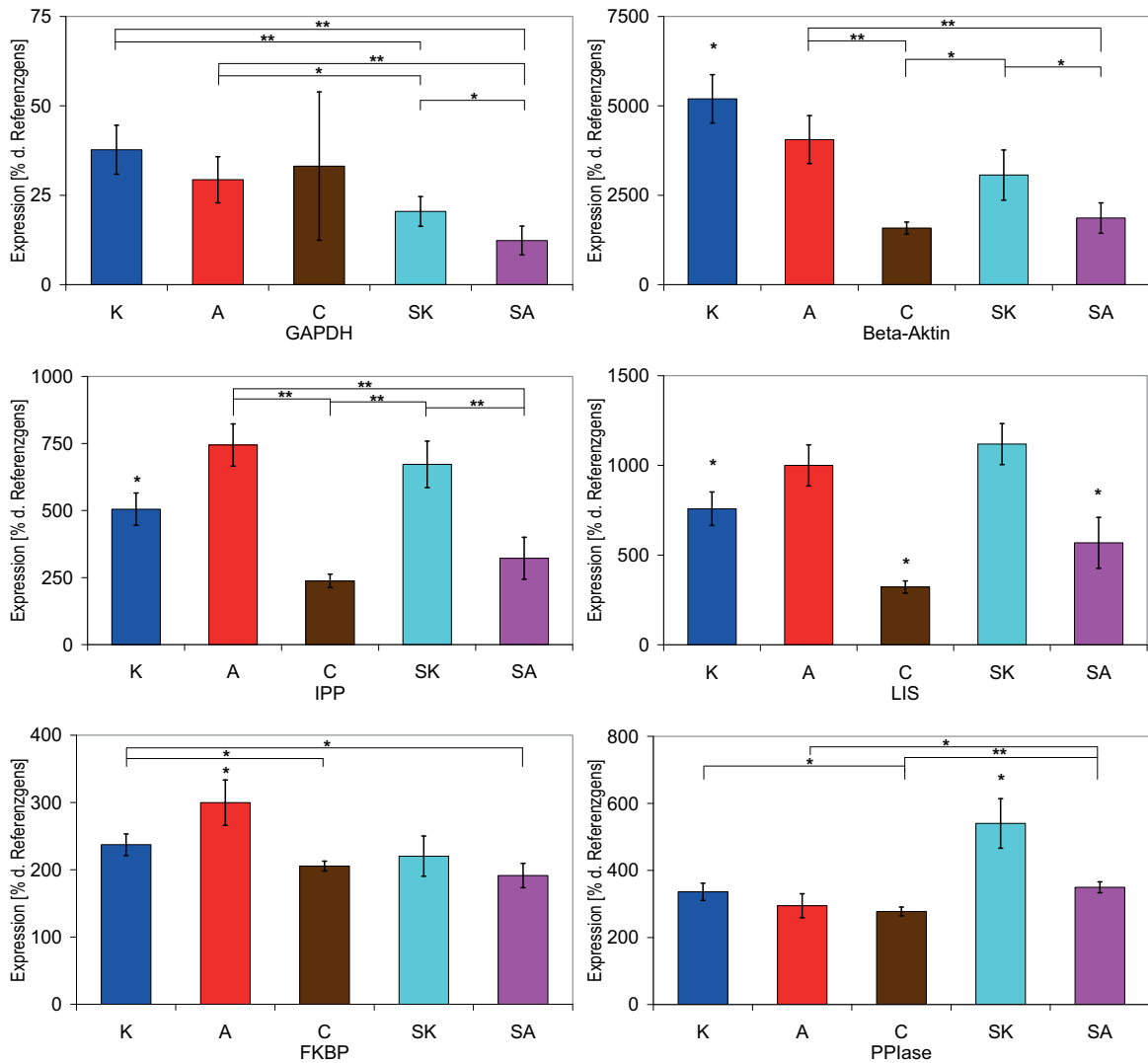


Abb. 3.3.3.5 Expressionsprofile der Kandidaten nach 120 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Die Expression von GAPDH ist nach 120 Minuten Inkubation niedriger als nach 90 Minuten, in der Kontrolle beträgt die Expression 38 % .Die Aldosteronprobe liegt mit 29 % nur knapp darunter ($p=0,153$), in der Corticosteronprobe finden sich 33 %, hier ist allerdings die Standardabweichung sehr hoch. Die Expression in der Spironolactonkontrolle (20 %) liegt deutlich unter der der Kontrolle ($p \leq 0,001$), der Wert für die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron liegt mit 12 % noch darunter ($p \leq 0,007$ gegen beide Kontrollen). Beta-Aktin hingegen zeigt mit 5200 % in der Kontrolle eine deutlich höhere Expression als nach 90 Minuten, in der Aldosteronprobe liegt der Wert mit 4000 % darunter ($p \leq 0,024$). Die

3. ERGEBNISSE

Spironolactonkontrolle liegt bei 3000 % ($p \leq 0,001$ gegen die Kontrolle), die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron bei 1800 % ebenfalls niedriger ($p \leq 0,007$ gegen beide Kontrollen). Der geringste Wert findet sich für die Corticosteronprobe, er beträgt 240 % (nicht signifikant gegen die Kombinationsprobe, jedoch gegen alle anderen Proben). Für IPP liegt die Expression auf einem höheren Niveau als nach 90 Minuten, in der Kontrolle finden sich 500 % der Expression des Referenzgens. Für die Aldosteronprobe liegt der Wert der Expression mit 750 % deutlich darüber ($p \leq 0,001$). Auch in der Spironolactonkontrolle ist der Wert mit 670 % gegenüber der Kontrolle erhöht ($p = 0,003$), die Kombinationsprobe weist hingegen eine geringere Expression mit 322 % auf ($p \leq 0,001$ gegen beide Kontrollen). Die niedrigste Expression findet sich für Corticosteron bei 297 % ($p = 0,115$ gegen die Kombinationsprobe, $p \leq 0,001$ im Vergleich mit allen anderen Proben). Die Expression von LIS zeigt ein ähnliches Muster. In der Kontrolle liegt der Wert (760 %) unter dem der Aldosteronprobe (1000 %) ($p = 0,002$). Die Spironolactonkontrolle (1100 %) hingegen liegt höher als die Kombinationsprobe (570 %) ($p \leq 0,001$). Auch hier findet sich die geringste Expression für Corticosteron mit 320 % ($p \leq 0,007$ gegen alle Proben).

Bei der Expression von FKBP liegt die höchste Expressionsrate in der Aldosteronprobe mit 300 % im Vergleich zum Referenzgen vor. Damit liegt ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (270 %) vor ($p = 0,004$). Die Werte der übrigen Proben liegen näher beieinander, in der Corticosteronprobe beträgt die Expression 205 %, in der Spironolactonkontrolle 220 % und in der Kombinationsprobe 190 % im Vergleich zur Expression des Referenzgens.

Die Expression von PPIAse liegt ebenfalls auf einem hohen Niveau, in der Kontrolle beträgt der Wert 340 % in der Aldosteronprobe 295 %; dieser Unterschied ist nicht signifikant. In der Corticosteronprobe finden sich 280 % im Vergleich zur Expression des Referenzgens. Die Inkubation mit Spironolacton führt zu einer erhöhten Expression von 540 %, dieser Wert ist statistisch signifikant unterschiedlich von allen anderen Proben. In der Kombinationsprobe liegt die Expression mit einem Wert von 340% auf dem gleichen Niveau wie die Expression in der Kontrolle ($p \geq 0,861$).

3. ERGEBNISSE

150 Minuten Inkubationszeit

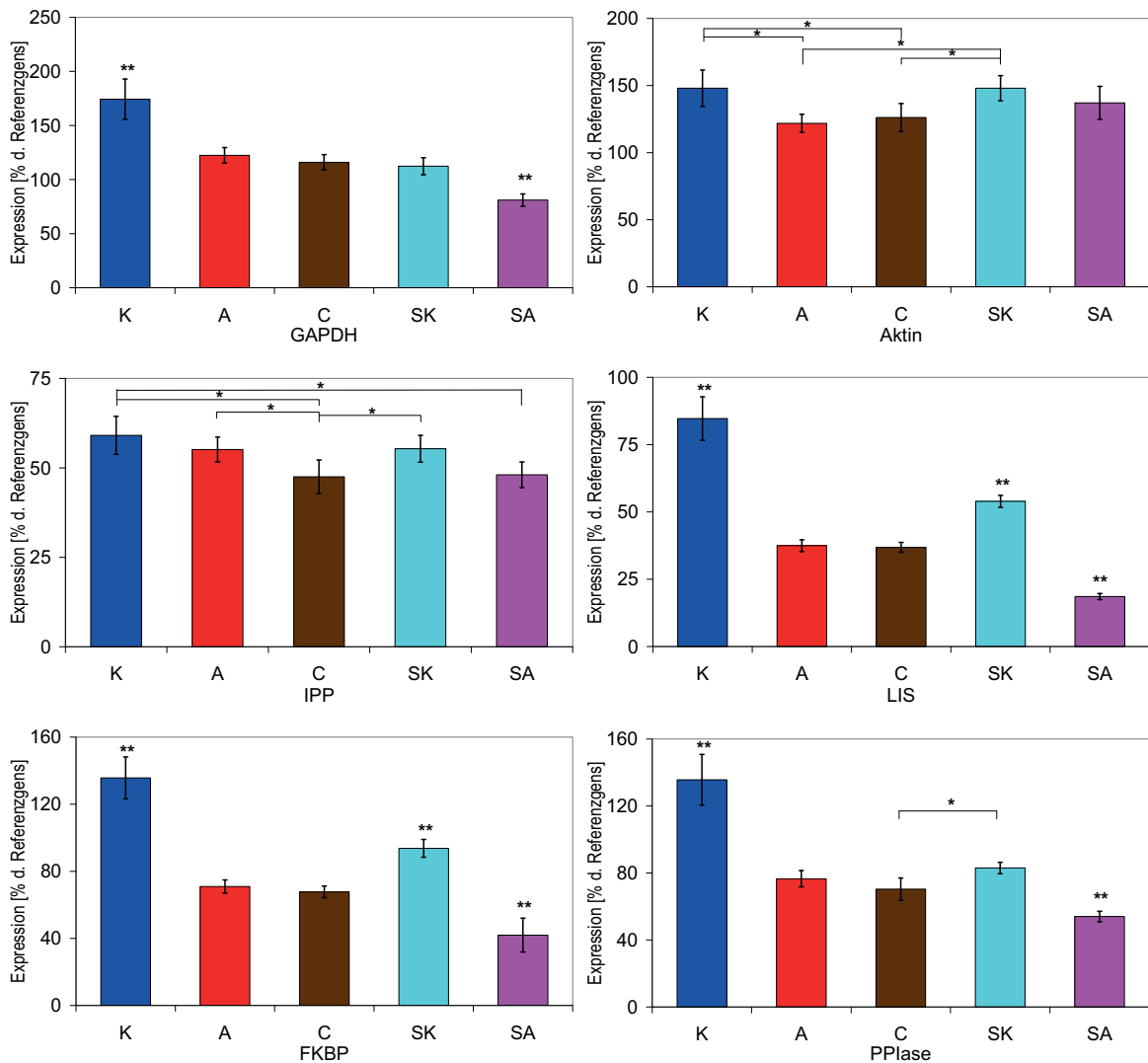


Abb. 3.3.3.6 Expressionsprofile der Kandidaten nach 150 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 150 Minuten ist die Expression von GAPDH erneut auf höherem Niveau. In der Kontrolle finden sich 175 % Expression im Vergleich zum Referenzgen ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben), der Wert in der Aldosteronprobe liegt mit 120 % auf dem gleichen Niveau wie in der Corticosteronprobe (116 %) und der Spironolactonkontrolle (112 %) ($p \geq 0,114$). In der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron hingegen liegt die Expression mit 81 % am niedrigsten ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben). Die Expression von Beta-Aktin liegt niedriger als nach 120 Minuten. Die beiden Kontrollen liegen mit 148 % auf dem gleichen

3. ERGEBNISSE

Niveau. In der Aldosteronprobe (122 %) und der Corticosteronprobe (126 %) finden sich vergleichbare Werte ($p \geq 0,984$). In der Kombinationsprobe liegt die Expression etwas höher bei 137 %, es gibt keine Unterschiede zu den übrigen Proben ($p \geq 0,199$). Für IPP ist die Expression nach 150 Minuten deutlich geringer als nach 120 Minuten. Sie liegt für alle Proben auf einem ähnlichen Niveau. Die Kontrolle liegt bei 49 %, die Aldosteronprobe bei 55 %, die Corticosteronprobe liegt mit 48 % etwas darunter, ebenso wie die Kombinationsprobe (48 %). In der Spironolactonkontrolle liegt der Wert mit 55 % auf gleichem Niveau wie in der Aldosteronprobe. Für die übrigen Kandidaten ergibt sich nach 150 Minuten Inkubationszeit ein ähnliches Expressionsprofil. Für LIS beträgt der Wert in der Kontrolle 85 % Expression und liegt damit am höchsten. Die Aldosteronprobe liegt mit 37 % auf gleicher Höhe wie Corticosteron, in der Spironolactonkontrolle liegt die Expression bei 54 % unterhalb der Expression in der Kontrolle, die Kombinationsprobe zeigt eine geringere Expression (19 %) als die Aldosteronprobe. Damit ergeben sich in der Expression von LIS gleiche Werte für die Aldosteron- und die Corticosteronprobe, während sich alle anderen Proben signifikant voneinander unterscheiden ($p \leq 0,001$).

Für FKBP beträgt die Expression in der Kontrolle 136 % und liegt damit annähernd doppelt so hoch wie in der Aldosteronprobe (70 %). Corticosteron (68 %) liegt auf gleicher Höhe wie Aldosteron. In der Spironolactonkontrolle liegt die Expression unter der Kontrolle, aber über dem Niveau von Aldosteron und Corticosteron. Die Kombinationsprobe zeigt wiederum die niedrigste Expression bei 42 %. Auch hier entsprechen sich die Werte aus Aldosteron- und Corticosteronprobe ($p = 0,543$), während sich für alle anderen Vergleiche eine Signifikanz mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$ ergibt. Die Expression von PPIase ergibt ganz ähnliche Werte wie FKBP. Die Kontrolle liegt bei 135 %, Aldosteron und Corticosteron zeigen 77 %, beziehungsweise 70 % ($p \leq 0,001$ gegen die Kontrolle). In der Spironolactonkontrolle beträgt die Expression 83 %, dies entspricht dem Niveau der Aldosteronprobe ($p = 0,053$) die Kombinationsprobe liegt mit 54 % Expression am niedrigsten ($p \leq 0,001$ gegen alle Proben).

3. ERGEBNISSE

180 Minuten Inkubationszeit

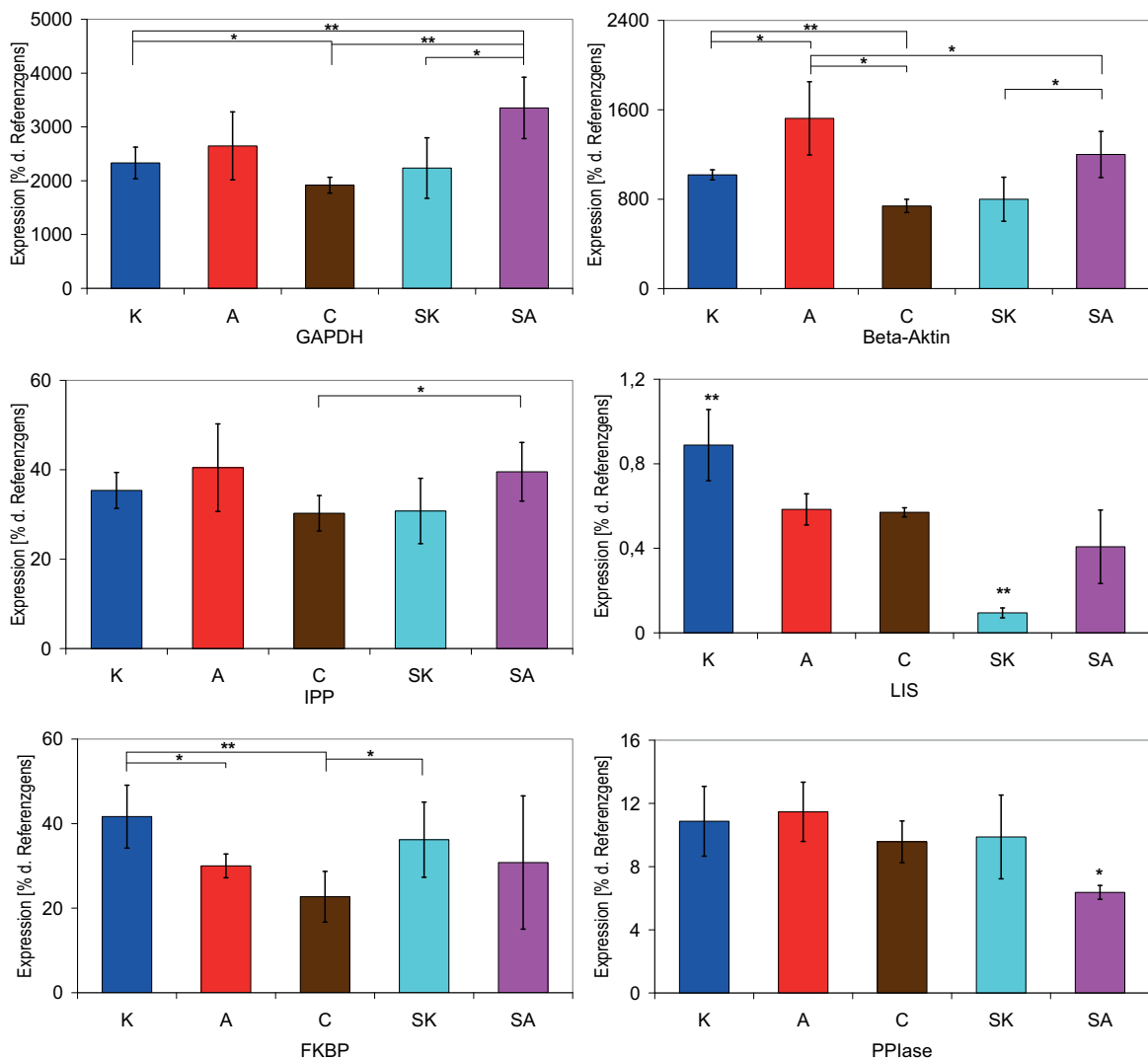


Abb. 3.3.3.6 Expressionsprofile der Kandidaten nach 180 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 µM Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 180 Minuten Inkubationszeit liegt die Expression von GAPDH erneut auf hohem Niveau. In der Kontrolle beträgt die Expression 2300 %, in der Aldosteronprobe liegt die Expression mit 2800 % etwas darüber ($p \geq 0,825$). Der Wert für die Corticosteronprobe beträgt 1800 %. In der Spironolactonkontrolle finden sich 1900 % Expression, die Kombinationsprobe zeigt mit 3300 % die höchste Expression von allen und unterscheidet sich signifikant von allen anderen Proben ($p \leq 0,007$) außer von der Aldosteronprobe.. Auch die Expression von Beta-Aktin liegt nach 180 Minuten auf hohem Niveau. Der höchste Expressionswert findet sich hier für die Aldosteronprobe (1600 %), die Kombinationsprobe mit 1200 % liegt etwas darunter. In der Kontrolle beträgt die Expression 990 %. Die Corticosteronprobe liegt mit

3. ERGEBNISSE

740 % auf dem Niveau der Spironolactonkontrolle (800 %). Damit ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Aldosteron-, bzw. Corticosteronprobe ($p \leq 0,014$) und der Kombinationsprobe gegen die Spironolactonkontrolle, die Aldosteronprobe und die Corticosteronprobe ($p \leq 0,006$).

Die Expression von IPP liegt auf einem niedrigeren Niveau als nach 150 Minuten, in der Kontrolle beträgt die Expression 35 % des Referenzgens, die Aldosteronprobe liegt mit einem Wert von 44 % etwas darüber, es gibt keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,89$). Auch hier liegen die Werte für die Corticosteronprobe (29 %) und die Spironolactonkontrolle (27 %) auf dem gleichen Niveau ($p = 0,766$). Der Wert für die Kombinationsprobe liegt bei 40 % ($p = 0,029$ gegen Corticosteron, keine Signifikanz gegen die übrigen Proben).

Bei der Expression von LIS unterscheiden sich beide Kontrollen jeweils signifikant von allen anderen Proben. Während in der Kontrolle die höchste Expression im Vergleich zum Referenzgen vorliegt, hat die Spironolactonkontrolle die niedrigste Expressionsrate. Die Werte der einzelnen Steroidproben unterscheiden sich nicht voneinander.

Bei der Expression von FKBP liegt der Wert für die Expression der Aldosteronprobe (30%) statistisch signifikant unter dem der Kontrolle (41%) ($p = 0,013$). In der Corticosteronprobe liegt der Wert mit 23% etwas darunter, aufgrund der höheren Standardabweichung entspricht dieses Niveau dem der Expression in der Aldosteronprobe ($p \geq 0,056$). In der Spironolactonkontrolle liegt die Expression bei 36 %, damit ist der Unterschied zur Expression in der Kombinationsprobe (31 %) nicht signifikant ($p \geq 0,983$).

Im Expressionsprofil von PPlase ist hingegen die Expression in der Kombinationsprobe mit 6,4 % unterschiedlich zu allen anderen Proben ($p \leq 0,032$), die sich ihrerseits mit Expressionswerten zwischen 9,6 % (Corticosteron) und 11,5 % (Aldosteron) nicht voneinander unterscheiden ($p \geq 0,206$).

3. ERGEBNISSE

210 Minuten Inkubationszeit

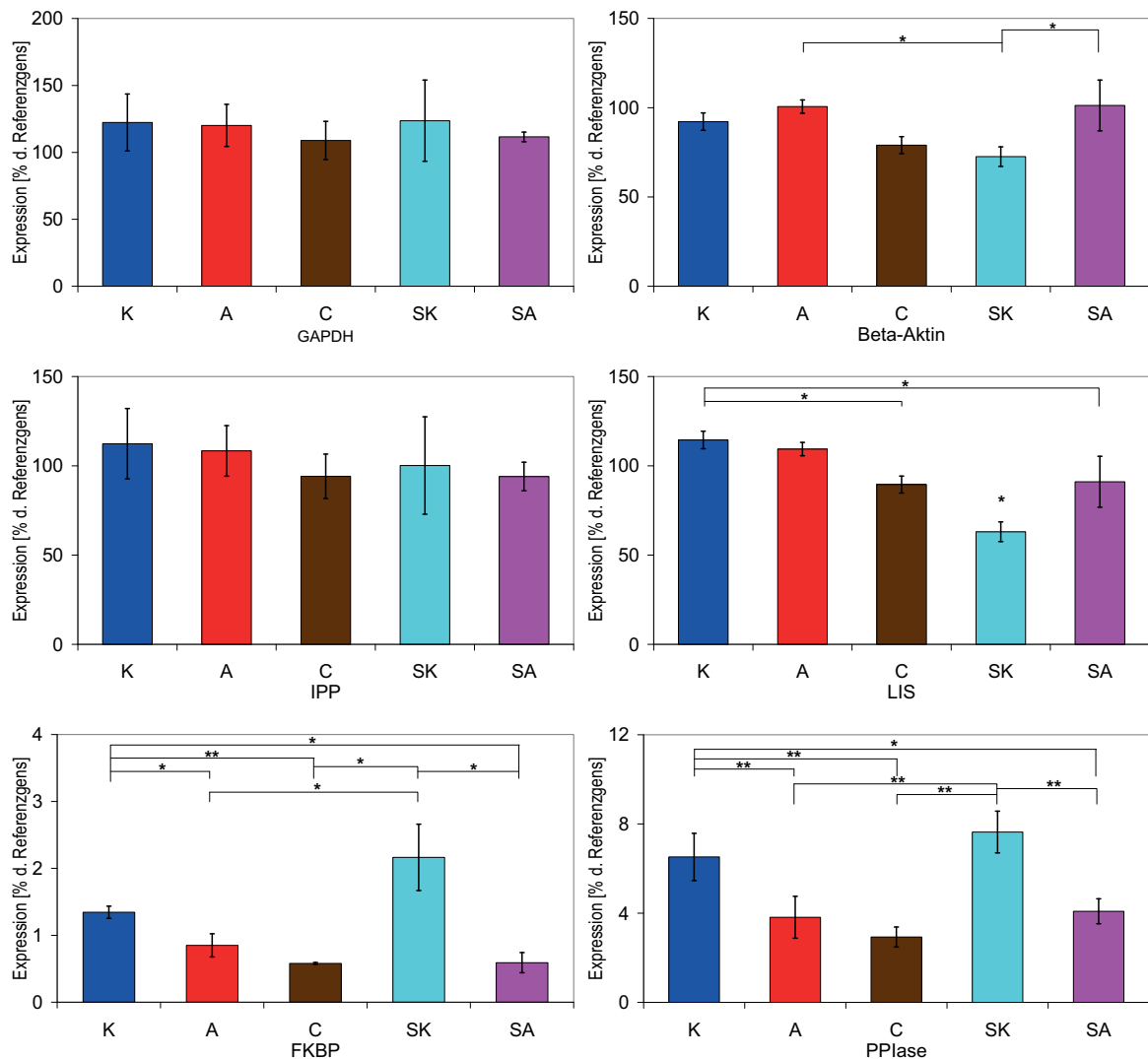


Abb. 3.3.3.8 Expressionsprofile der Kandidaten nach 210 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 210 Minuten Inkubationszeit ergeben sich für die Expression von GAPDH keine Unterschiede zwischen den Proben. Alle Werte liegen zwischen 109 % (Corticosteron) und 123 % (Spironolactonkontrolle), bereits im ANOVA-Test wird die Einheitlichkeit der Mittelwerte mit einem p -Wert von 0,376 bestätigt. Auch für die Expression von Beta-Aktin liegen die Werte der einzelnen Proben nahe beieinander, der niedrigste Wert beträgt hier 72 % in der Spironolactonkontrolle, die höchsten Werte zeigen die Kombinationsprobe (101 %) und die Aldosteronprobe (100 %), hier sind lediglich die Unterschiede zwischen der Spironolactonkontrolle und der Kombinationsprobe ($p \leq 0,033$), bzw. der Aldosteronprobe ($p \leq 0,039$) statistisch signifikant. Die Expressionswerte von IPP in den einzelnen Proben liegen auf einem einheitlichen Niveau in Höhe des Referenzgens, auch hier zeigt bereits der

3. ERGEBNISSE

ANOVA-Test gleiche Mittelwerte ($p=0,111$). Die Expression von LIS nach 210 Minuten Inkubationszeit ergibt gleich hohe Werte für die Kontrolle (114 %) und die Aldosteronprobe (109 %). Die übrigen Proben liegen etwas niedriger, in der Corticosteronprobe finden sich 90 % Expression, die Spironolactonkontrolle weist 63 % Expression auf und in der Kombinationsprobe liegt der Wert bei 91 %. Die Expression von FKBP und PPlase hingegen liefert unterschiedlich hohe Expressionsraten in den Proben, allerdings erfolgt die Expression für beide Kandidaten auf einem sehr niedrigen Niveau. Die Expression in der Aldosteronprobe ist geringer als in beiden Kontrollen ($p\leq 0,08$), der Unterschied zur Expression in der Corticosteron- und der Kombinationsprobe ist hingegen nicht signifikant ($p\geq 0,117$). Für beide Kandidaten findet sich jeweils die höchste Expression in den Spironolactonkontrollen. Bei der Expression von PPlase ist der Unterschied zwischen den beiden Kontrollen geringer als bei der Expression von FKBP, auch hier liegen die beiden Kontrollen statistisch auf gleicher Höhe ($p\geq 0,572$) und unterscheiden sich von allen Steroidproben, die ihrerseits auf einem einheitlichen Niveau liegen ($p\geq 0,227$).

3. ERGEBNISSE

240 Minuten Inkubationszeit

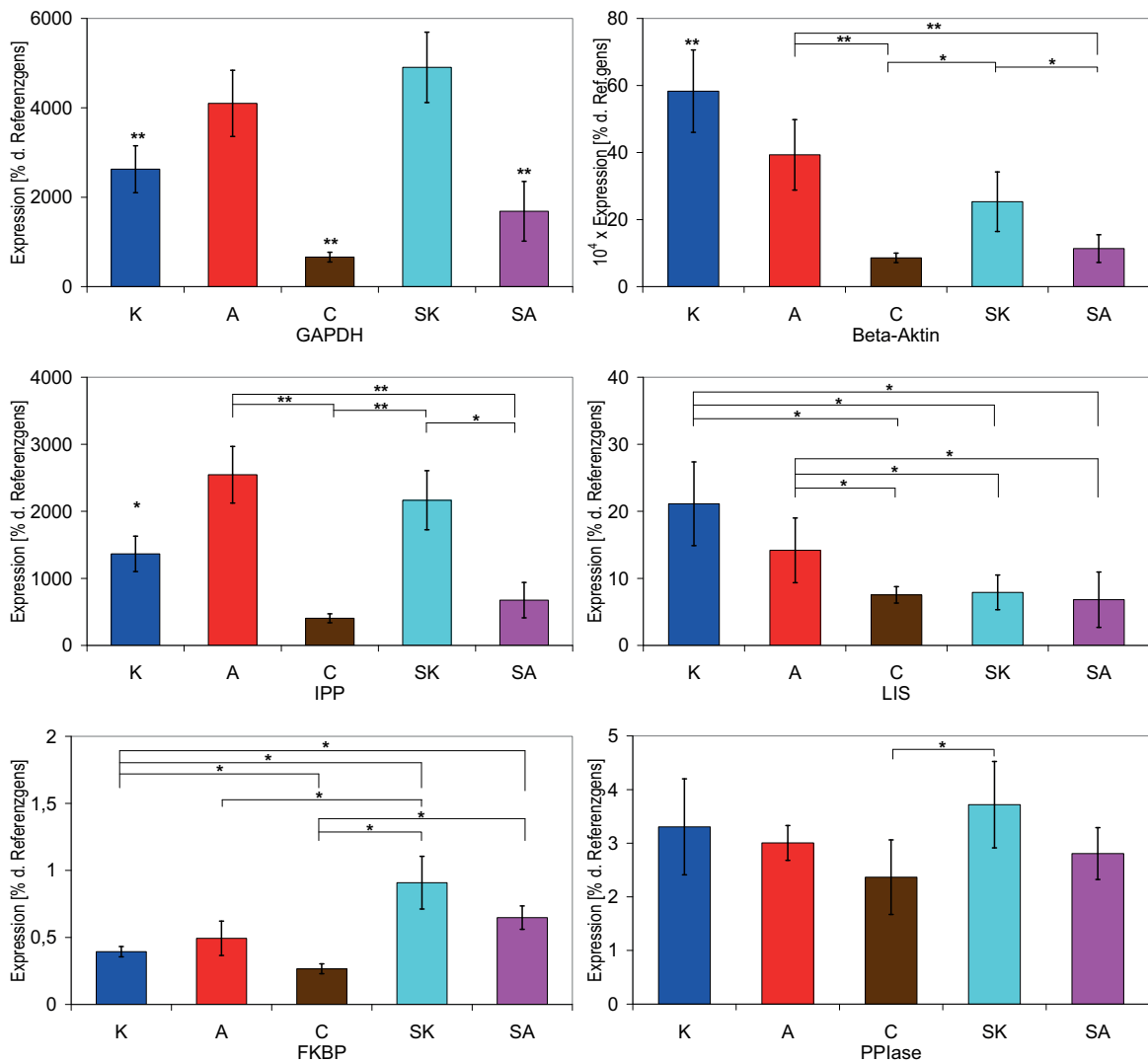


Abb. 3.3.3.9 Expressionsprofile der Kandidaten nach 240 Minuten Inkubationszeit in HCT116-Zellen. Die Inkubation mit Steroiden erfolgte mit jeweils 10 nM Aldosteron (A), bzw. Corticosteron (C) in Ethanol. Den Kontrollen (K) wurde die gleiche Menge Ethanol zugesetzt. Spironolactonproben wurden für 30 Minuten mit 10 μ M Spironolacton präinkubiert, bevor sie mit Aldosteron (SA), bzw. Ethanol (SK) versetzt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Proben sind durch Klammern gekennzeichnet, ist eine Probe signifikant unterschiedlich zu allen anderen, ist wegen der besseren Übersicht lediglich die Probe gekennzeichnet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Nach 240 Minuten Inkubationszeit ist die Expression für GAPDH, Beta-Aktin und IPP auf hohem Niveau, LIS, FKBP und PPlase hingegen werden niedrig exprimiert. Für GAPDH liegt die Expression der Kontrolle bei 2600 %, der Wert in der Aldosteronprobe ist mit 4100 % höher als in der Kontrolle ($p \leq 0,002$). Die Spironolactonkontrolle liefert mit 4900 % eine noch höhere Expression ($p \leq 0,001$). In der Kombinationsprobe ist die Expression hingegen auf einen Wert von 1700 % abgesenkt ($p \leq 0,045$ gegen alle Proben), die niedrigste Expression findet sich in der Corticosteronprobe, sie beträgt 660 % des Referenzgens ($p \leq 0,016$ gegen alle Proben). Auch die Expression von Beta-Aktin ist hoch. Die höchste Expression findet sich in der Kontrolle mit 58×10^4 %. Der Wert für die Aldosteronprobe liegt mit 40×10^4 %

3. ERGEBNISSE

darunter ($p \leq 0,029$), in der Spironolactonkontrolle beträgt die Expression $25 \times 10^4 \%$ des Referenzgens, damit liegen die Aldosteronprobe und die Spironolactonkontrolle auf vergleichbarer Höhe ($p \geq 0,069$). Der Wert in der Kombinationsprobe liegt bei $11 \times 10^4 \%$, die Corticosteronprobe zeigt mit $8,5 \times 10^4 \%$ die geringste Expression, beide Proben unterscheiden sich nicht voneinander ($p \geq 0,504$), jedoch von allen anderen Proben ($p \leq 0,011$). Für IPP ergibt die Expression in der Aldosteronprobe höhere Werte (2500 %) als in der Kontrolle (1300 %) ($p \leq 0,001$). Die Spironolactonkontrolle liegt mit 2200 % ähnlich hoch wie die Aldosteronprobe ($p = 0,505$), in der Kombinationsprobe finden sich lediglich 670 % Expression. Corticosteron zeigt auch hier die geringste Expression mit 404 %. Damit liegen die Corticosteronprobe und die Kombinationsprobe auf einem Niveau ($p \geq 0,118$), unterscheiden sich jedoch von den anderen Proben ($p \leq 0,001$).

Die Expression von LIS liegt nach 240 Minuten auf einem deutlich niedrigeren Niveau als nach 210 Minuten. Die höchste Expression findet sich in der Kontrolle (21 %), die Aldosteronprobe liegt mit 14 % Expression etwas darunter (keine Signifikanz, $p \geq 0,152$). Die übrigen Proben liegen mit 7 % bis 8 % Expression auf dem gleichen Niveau ($p \geq 0,998$). Die Expression von FKBP ist am stärksten in der Spironolactonkontrolle (1 %). In der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron finden sich 0,6 % Expression des Referenzgens; der Unterschied zur Spironolactonkontrolle ist nicht signifikant ($p \geq 0,147$). Die Aldosteronprobe zeigt 0,5 % Expression, die Expression liegt in der Kontrolle mit 0,4 % noch darunter. Kontrolle und Aldosteronprobe unterscheiden sich nicht voneinander ($p \geq 0,568$). Der niedrigste Expressionswert findet sich für die Corticosteronprobe mit 0,26 %, er ist signifikant unterschiedlich von beiden Kontrollen ($p \leq 0,04$) und der Kombinationsprobe, nicht aber von der Aldosteronprobe ($p \leq 0,61$).

Für die Expression von PPlase nach 240 Minuten liegen die Werte der einzelnen Proben aufgrund der hohen Standardabweichungen auf dem gleichen Niveau, lediglich der Unterschied zwischen der Corticosteronprobe und der Spironolactonkontrolle ist signifikant ($p \leq 0,19$). Sie liegen zwischen 2,4 % (Corticosteron) und 3,7 % (Spironolactonkontrolle).

3.4 Untersuchungen der Kandidaten auf Proteinebene (Western Blot)

Die Untersuchungen auf Proteinebene erfolgten in einem kleineren Maßstab als die RT-PCR. Für PPlase war kommerziell kein Antikörper verfügbar. Die PPlase gehört zur gleichen Enzymklasse wie FKBP, beide Proteine katalysieren die *cis-trans*-Isomerisierung von Prolinresten innerhalb von Proteinen. Während PPlase zur Familie der Cyclophiline gehört, handelt es sich bei FKBP um ein Mitglied der Familie der FK bindenden Proteine. Die Ausgangsüberlegung war hierbei, neben PPlase FKBP zur Untersuchung heranzuziehen, um wenigstens für ein Mitglied der Peptidyl-Prolyl *cis-trans* Isomerasen vergleichende Ergebnisse auf RNA- und Proteinebene zu erhalten. Ein polyklonaler Antikörper gegen FKBP 52 aus Kaninchenserum wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gunter Fischer (Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle) zur Verfügung gestellt. Leider stellte sich heraus, dass der Antikörper für keine der untersuchten Zelllinien spezifische Signale zeigte. Für die humane Zelllinie HCT 116 und die Kardiomyocytenzelllinie HL-1 ergaben sich unspezifische Banden über den gesamten Größenbereich des Gels, für die primären Fibroblasten blieben die Blots leer (vgl. Abb. 3.4.1). Daher wurden nur Western Blot Untersuchungen für die Proteine GAPDH, Beta-Aktin, Lis und IPP durchgeführt.

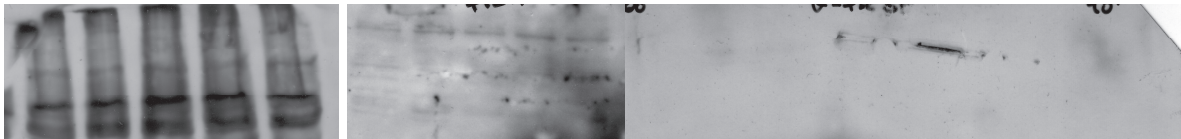


Abb. 3.4.1 Western Blots mit dem Antikörper gegen FKBP 52 führten zu unspezifischen Signalen in HCT 116 Zellen (links) und HL-1 Zellen (Mitte), während bei primären Fibroblasten keine Signale auftraten.

Der Antikörper gegen die anorganische Pyrophosphatase (IPP) war der einzige polyklonale Antikörper, der verwendet wurde. Obwohl der Antikörper zunächst in allen Zelllinien auf Funktionalität getestet wurde, ergaben sich während der Experimente nur in wenigen Fällen Expressionsstärken, die im Blot zu Signalen führten.

Für die Kardiomyozytenzelllinie HL-1 konnte unter Standardbedingungen zu keiner Inkubationszeit die Expression von IPP nachgewiesen werden. Um überhaupt ein Signal zu erhalten, war es nötig, das Gel massiv mit Protein zu überladen (60 µg).

Für die Fibroblasten und die HCT-Zellen gab es wenige Zeiten, bei denen schwache Banden vor starkem Hintergrund zu detektieren waren. Da sich in diesen Fällen die Expression zwischen den Proben kaum unterschied und nicht genügend Blots mit Signalen für eine Beobachtung über den Zeitverlauf vorliegen, werden sie hier nicht gezeigt.

3.4.1 Expression der Kandidaten in Fibroblasten

Für alle Untersuchungen der Expression auf Proteinebene wurden jeweils gleiche Proteinmengen aufgetragen. Für Fibroblasten wurden 10µg Gesamtprotein pro Spur eingesetzt. Die Western Blots lieferten für die Antikörper gegen GAPDH, Beta-Aktin und LIS in der Regel klare Signale mit wenig Hintergrund (vgl. Abb.3.4.1). Lediglich bei sehr schwachen Signalen, die eine lange Expositionszeit erforderten, gab es eine stärkere Hintergrundfärbung, ohne dass jedoch weitere Banden auftraten.

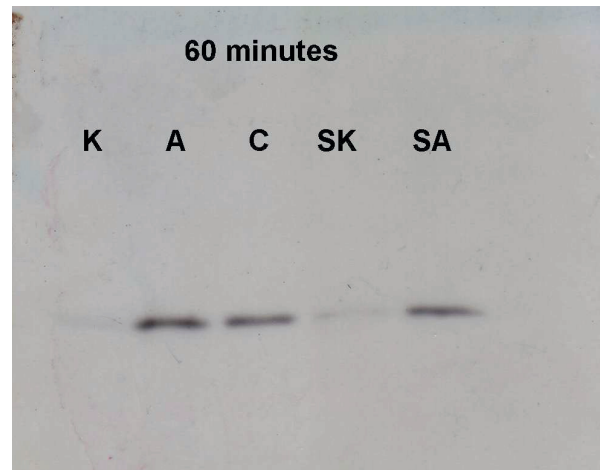


Abb. 3.4.1 Immunonachweis der Expression von LIS in Fibroblasten nach 60 Minuten Inkubationszeit. Fibroblasten in Zellkultur wurden mit jeweils 10nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, die Konzentration bestimmt und auf 0,5 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der Immunonachweis mit dem monoklonalen Antikörper gegen LIS und die anschließende ECL-Detektion führten zu deutlichen Banden und wenig Hintergrund.

Der besseren Übersicht halber werden aus den Blots im Folgenden nur die Banden gezeigt.

3.4.1.1 Expression von GAPDH in Fibroblasten

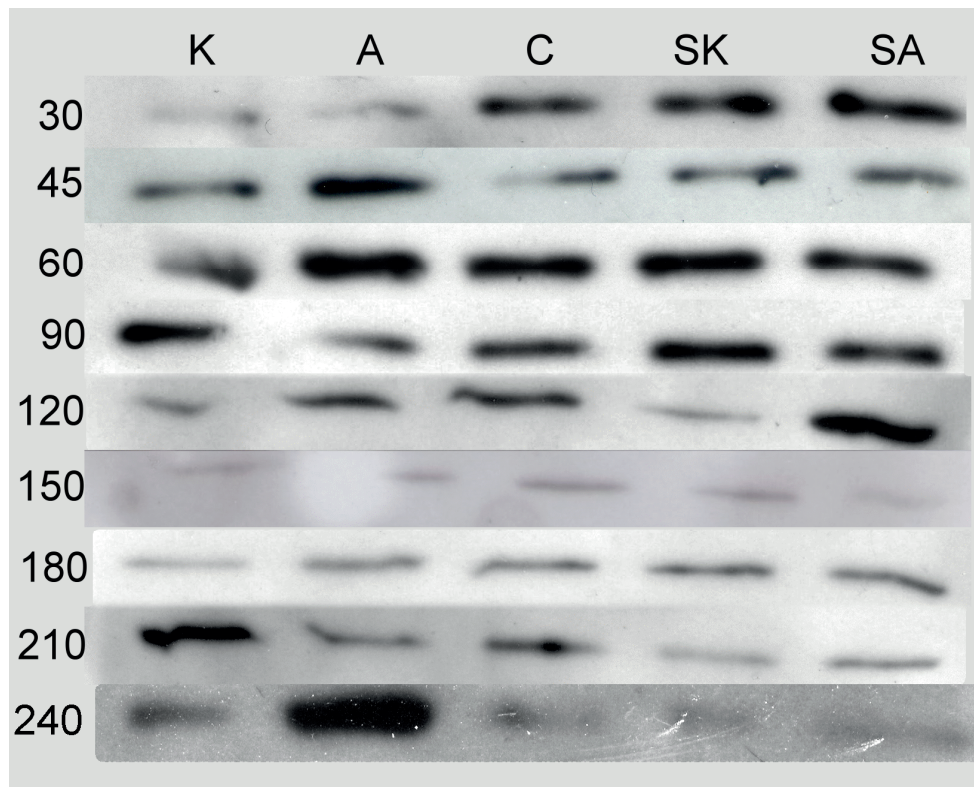


Abb. 3.4.1.1 Expression von GAPDH in Fibroblasten im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. Fibroblasten in Zellkultur wurden mit jeweils 10nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, die Konzentration bestimmt und auf 0,5 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der Nachweis der Expression erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, der zur Erzeugung eines Bildes gescannt wurde. Die Abbildung zeigt, dass die Expression von GAPDH in Fibroblasten in allen Proben großen dynamischen Schwankungen ausgesetzt ist.

Um einen besseren Vergleich der Expression im Zeitverlauf zu ermöglichen, wurden die Signale der Western Blots ausgeschnitten und entsprechend der Inkubationsdauer pro Antikörper in eine gemeinsame Abbildung arrangiert. Abb. 3.4.1.1 zeigt das Expressionsprofil von GAPDH in Fibroblasten über den gesamten Inkubationszeitraum. Für alle Experimente wurden jeweils die gleichen Proteinmengen eingesetzt. Auffällig ist, dass die Signale sich im Zeitverlauf stark unterscheiden. Im ersten Untersuchungszeitraum (30 Minuten) ergeben sich schwache Signale für GAPDH in der Kontrolle und der Aldosteronprobe. Die Expression der beiden Proben scheint gleich hoch. Demgegenüber sind die Signale in der Corticosteronprobe sowie der Spironolactonkontrolle etwas deutlicher zu sehen. Die Kombinationsprobe zeigt ein Signal, dessen Intensität etwas höher ist. Nach 45 Minuten

3. ERGEBNISSE

ergibt sich ein vollkommen anderes Bild. Die Expression in der Kontrolle sowie in der Corticosteronprobe und den beiden Spironolactonproben ist ungefähr gleich hoch und liegt in der Intensität leicht über den Signalen der Kontrolle nach 30 Minuten. Die Aldosteronprobe zeigt als einzige ein stärkeres Signal. Nach 60 Minuten wiederum ist die Signalstärke in allen Proben deutlich höher. Die Aldosteronprobe ist gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Die Signale in der Corticosteronprobe und der Spironolactonkontrolle liegen auf gleichem Niveau, sie sind etwas stärker als in der Kontrolle, das Signal ist jedoch schwächer als in der Aldosteronprobe. In der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron fällt das Signal schwächer aus, die Intensität gleicht der Kontrolle. Nach 90 Minuten Inkubationsdauer sind die Signale in allen Proben schwächer. Die stärksten Signale liegen in den Kontrollen vor. Die Signalstärke in der Aldosteronprobe ist gleich hoch wie in der Corticosteron- und der Kombinationsprobe. Nach 120 Minuten ergibt sich reziprokes Bild, nun ist die Intensität der Signale in den Kontrollen am geringsten. Die Aldosteron- und Corticosteronprobe zeigen stärkere Signale. Die Intensität der Kombinationsprobe wiederum liegt noch deutlich höher. Die Expression nach 180 Minuten ist in allen Proben sehr viel schwächer, es gibt kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Proben, lediglich die Kombinationsprobe scheint von leicht geringerer Intensität als die anderen Proben. Im weiteren Zeitverlauf nimmt die Expression wieder leicht zu, die Stärke der Banden ist hierbei in allen Proben ähnlich, lediglich die Signalstärke liegt in der Kontrolle leicht unterhalb der anderen Proben. Nach 210 Minuten zeigt die Kontrolle das stärkste Signal, die Bande ist deutlich stärker als in den anderen Proben, die sich untereinander nicht in der Größe der Banden unterscheiden. In der Intensität des Signals liegt die Corticosteronprobe leicht über der Aldosteron- und der Kombinationsprobe. Die Intensität der Spironolactonkontrolle liegt noch leicht darunter. Nach 240 Minuten ist die Größe des Signals in allen Proben höher, in der Intensität ergeben sich beträchtliche Unterschiede. Das Signal in der Aldosteronprobe liegt in der Intensität deutlich über allen anderen Signalen. Die Signalstärke in der Kontrolle ist etwas höher als in der Corticosteronprobe und den Spironolactonproben, die sich voneinander nicht unterscheiden.

3.4.1.2 Expression von LIS in Fibroblasten

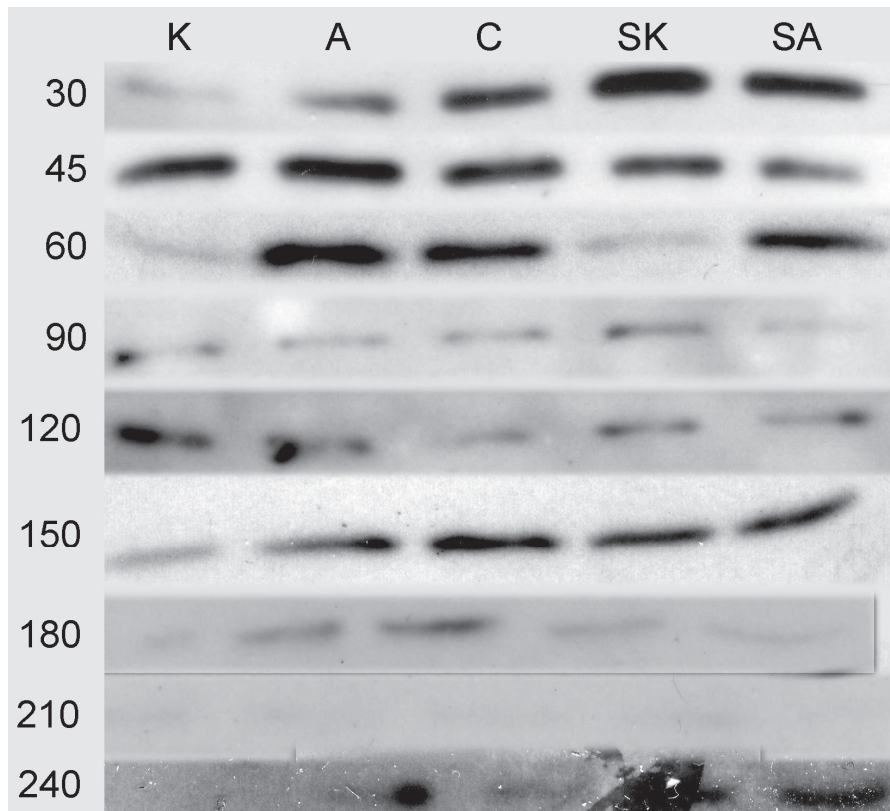


Abb. 3.4.1.2 Expression von LIS in Fibroblasten im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. Fibroblasten in Zellkultur wurden mit jeweils 10nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, die Konzentration bestimmt und auf 0,5 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der Nachweis der Expression erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, der zur Erzeugung eines Bildes gescannt wurde. Nach kurzen Inkubationszeiten (bis 60 min) ist die Expression von LIS in allen Proben deutlich höher stärker, dabei zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Proben.

Die Expression von LIS in Fibroblasten ist ebenfalls Schwankungen im Zeitverlauf unterworfen. Nach 30 Minuten Inkubationszeit ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei der Expression von GAPDH. Die Signale in der Kontrolle liegen in ähnlicher Stärke vor wie in der Aldosteronprobe. Die Corticosteronprobe zeigt ein etwas höheres Signal.

Das stärkste Signal zeigt die Spironolactonkontrolle, aber auch in der Kombinationsprobe ist das Signal stärker ausgeprägt als in der Corticosteronprobe. Nach 45 Minuten Inkubationszeit sind die Signale in der Kontrolle und der Aldosteronprobe stärker ausgeprägt als nach 30 Minuten, die Signale erreichen in etwa die gleiche Stärke wie sie die Spironolactonproben nach 30 Minuten zeigten. Die Corticosteronprobe liegt ungefähr in der

3. ERGEBNISSE

gleichen Intensität vor, es liegt somit kaum ein Unterschied zu vorherigen Inkubationszeit vor. Die Spironolactonproben unterscheiden sich wiederum von den anderen Proben, diesmal liegen sie schwächer ausgeprägt vor. Betrachtet man die Inkubationszeit von 60 Minuten, so ergibt sich ein vollkommen anderes Bild. Die Intensität in der Corticosteronprobe ist im Vergleich zu den vorherigen Zeiten gleich geblieben. Die übrigen Proben unterscheiden sich hingegen: in der Kontrolle ist das Signal wesentlich schwächer ausgeprägt als in den vorherigen Zeiten. In der Aldosteronprobe ist die Expression noch leicht angestiegen, hier liegt das stärkste Signal vor. In der Spironolactonkontrolle ist die Expression geringer, die Signalstärke ist vergleichbar mit der Kontrolle. In der Kombinationsprobe ist die Expression wiederum angestiegen, das Signal liegt nur schwach unterhalb der Aldosteronprobe, aber deutlich über der Spironolactonkontrolle.

Nach 90 Minuten ist die Expression in allen Proben auf einem niedrigen Niveau, dabei sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Proben zu beobachten. Auch nach 120 Minuten Inkubationszeit liegt die Expression auf einem niedrigen Niveau. Die Kontrolle zeigt hier das stärkste Signal, die Signale der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle liegen etwas darunter, die Corticosteronprobe und die Kombinationsprobe zeigen die schwächsten Signale, insgesamt sind die Unterschiede zwischen den Proben gering. Nach 150 Minuten sind die Signale in allen Proben etwas stärker, liegen insgesamt auf dem gleichen Niveau, lediglich die Intensität in der Kontrolle liegt etwas unter der der anderen Proben. Im weiteren Zeitverlauf nimmt die Expression von Lis ab. Nach 180 Minuten sind in allen Proben Signale noch gut nachweisbar, nach 210 Minuten liegen die Signale nur knapp über dem Hintergrund. Nach 240 Minuten ist die Expression in der Aldosteronprobe sowie den Spironolactonproben etwas höher als in der Corticosteronprobe und der Kontrolle.

3.4.1.3 Expression von Beta-Aktin in Fibroblasten

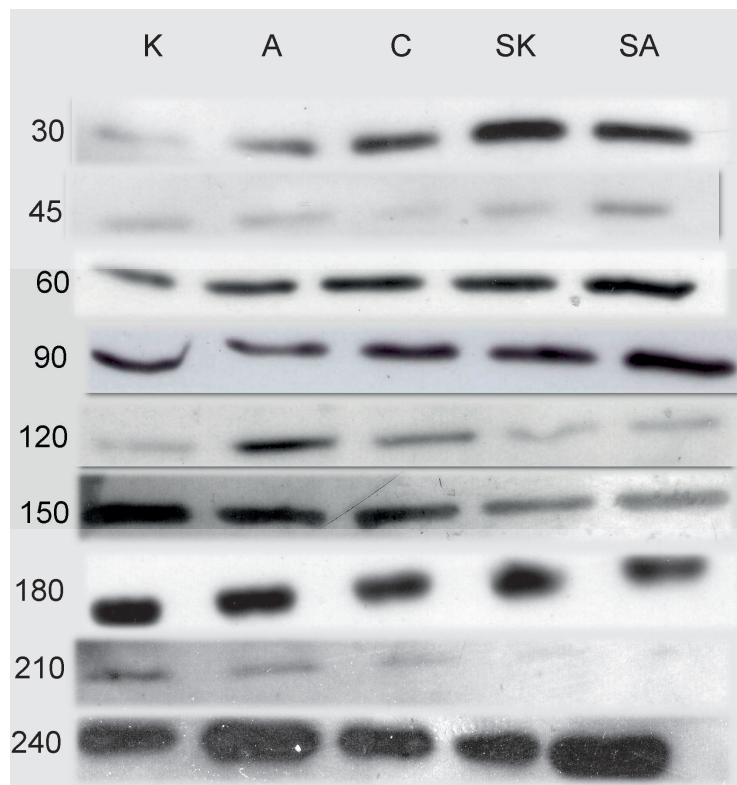


Abb 3.4.1.3 Expression von Beta-Aktin in Fibroblasten im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. Fibroblasten in Zellkultur wurden mit jeweils 10nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, die Konzentration bestimmt und auf 0,5 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Der Nachweis der Expression erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, der zur Erzeugung eines Bildes gescannt wurde. Wie GAPDH ist die Expression von Beta-Aktin großen Schwankungen unterworfen.

Auch die Expression von Beta-Aktin schwankt im Zeitverlauf. Nach 30 Minuten zeigt die Kontrolle das schwächste Signal. Die Aldosteronprobe und Corticosteronprobe sind leicht erhöht, die Spironolactonproben zeigen noch höhere Expression. Das stärkste Signal liegt in der Spironolactonkontrolle vor. Zum nächsten Untersuchungszeitpunkt von 45 Minuten liegt die Expression in allen Proben ungefähr gleichhoch, das Expressionsniveau ist jedoch deutlich niedriger als nach 30 Minuten. Nach 60 Minuten ist Beta-Aktin wieder stärker exprimiert, alle Proben zeigen ungefähr die gleiche Signalstärke. Nach 90 Minuten ist das Expressionsniveau ungefähr gleich hoch, lediglich die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron liegt etwas höher. Nach 120 Minuten ist das Signal in allen Proben schwächer, jedoch ergeben sich Unterschiede zwischen den Proben. Das stärkste Signal liegt in der Aldosteronprobe vor, die Corticosteronprobe liegt mit ihrem Signal knapp darunter. Die übrigen Proben zeigen gleiche Signalstärke in noch schwächerer Intensität.

3. ERGEBNISSE

Beim nächsten Untersuchungszeitpunkt von 150 Minuten ergibt sich ein anderes Bild. In allen Proben liegt stärkere Expression vor, das stärkste Signal wird nun in der Kontrolle beobachtet. Die Aldosteronprobe und die Corticosteronprobe zeigen gleiche Signalintensität, ebenso die beiden Spironolactonkontrolle, die in ihrer Intensität etwas unter den Steroidproben liegen. Nach 180 Minuten Inkubationszeit liegt eine deutlich stärkere Expression in allen Proben vor, hierbei gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Proben. Nach 210 Minuten liegt fast keine Expression vor, die Kontrolle, die Aldosteronprobe und die Corticosteronprobe zeigen gleich schwache Signale, die Spironolactonproben liegen noch darunter und können nur als Schatten wahrgenommen werden. Nach 240 Minuten wiederum ist die Expression in allen Proben auf hohem Niveau, die Aldosteronprobe und die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron eine etwas höhere Intensität zeigen als die anderen Proben.

3.4.2 Expression der Kandidaten in HL-1 Zellen

Für die Expressionsanalysen der Kandidaten in HL-1 Zellen wurden ebenfalls gleiche Proteinmengen von 10 µg Gesamtprotein je Spur eingesetzt. Da die Zelldichte bei HL-1 Zellen höher war als bei den primären Fibroblasten, ergaben sich bei der Präparation höhere Proteinkonzentrationen, die auf 1 µg/µl eingestellt wurden.

3.4.2.1 Expression von GAPDH in HL-1 Zellen

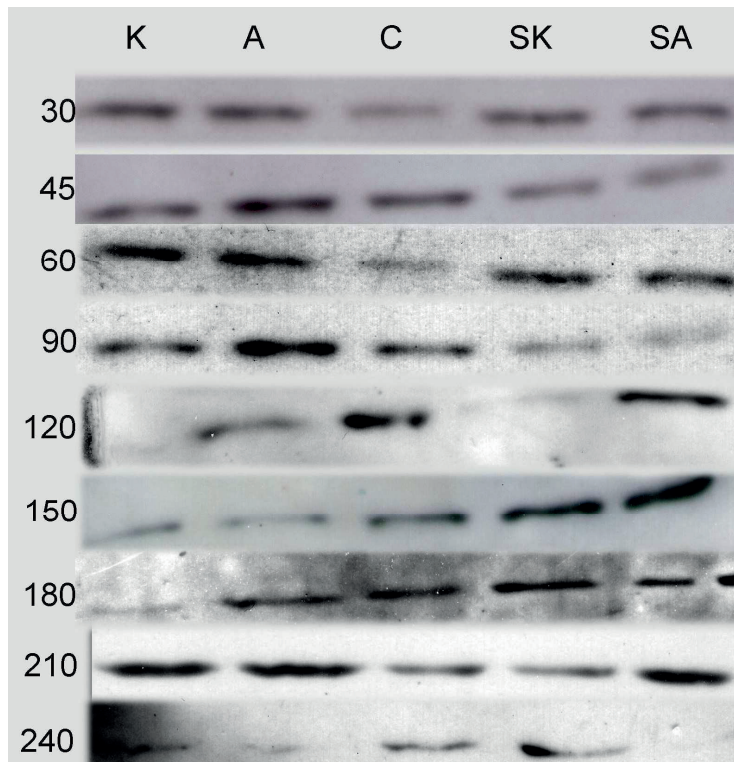


Abb. 3.4.2.1 Expression von GAPDH in HL-1 Zellen im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. HL-1Zellen wurden mit jeweils 10 nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, und die Proteinkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Zum Expressionsnachweis wurde ein monoklonaler Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, der zur Erzeugung eines Bildes gescannt wurde. Die Abbildung zeigt Schwankungen in der Expression über die Zeit, die jedoch geringer sind als in Fibroblasten.

Für die Expression von GAPDH liegt nach 30 Minuten Inkubationszeit Corticosteron als einzige Probe mit einer schwächeren Intensität vor. Nach 45 Minuten hat sich die Intensität in der Corticosteronprobe der Kontrolle und den Spironolactonproben angeglichen, lediglich in der Aldosteronprobe liegt das Signal in einer leicht stärkeren Intensität vor. Nach 60 Minuten Inkubationszeit ergibt sich das gleiche Bild wie nach 30 Minuten, die Corticosteronprobe liegt als einzige in der Intensität niedriger als die anderen Proben. Insgesamt ist das Expressionsniveau gleich geblieben. Nach 90 Minuten verschieben sich

3. ERGEBNISSE

die Intensitäten zwischen den Proben. Die Corticosteronprobe liegt in gleicher Intensität die Kontrolle vor, die Aldosteronprobe liegt darüber, während die beiden Spironolactonproben eine gleiche Signalintensität unterhalb der der Kontrolle zeigen. Nach 120 Minuten ist das Signal in der Kontrolle nur schwach wahrzunehmen, die Aldosteronprobe liegt in ihrer Intensität darüber, jedoch auf einem deutlich niedrigeren Expressionsniveau als zum vorherigen Zeitpunkt. Die Spironolactonkontrolle ist in ihrer Intensität leicht verringert, die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron dagegen zeigt ein deutlich stärkeres Signal. In der Corticosteronprobe liegt die größte Signalintensität vor. Nach 150 Minuten ist das Signal in der Kontrolle leicht angestiegen, in der Aldosteronprobe leicht abgesunken, beide Proben zeigen nun eine gleiche Signalstärke. Die Intensität in der Corticosteronprobe liegt nur geringfügig höher. Beide Spironolactonproben hingegen zeigen eine deutlich höhere Expression als die anderen Proben. Nach 180 Minuten ist das Signal in der Kontrolle am schwächsten, die anderen Proben liegen auf gleichem Niveau etwas darüber. Nach 210 Minuten können gleiche Signalintensitäten für die Kontrolle, die Aldosteronprobe und die Kombinationsprobe entdeckt werden beobachtet werden, die Corticosteronprobe und die Spironolactonkontrolle liegen leicht darunter. Nach 240 Minuten ist die Expression in allen Proben niedriger, die beiden Kontrollen zeigen dabei etwas höhere Werte als die Steroidproben.

3.4.2.2 Expression von LIS in HL-1 Zellen

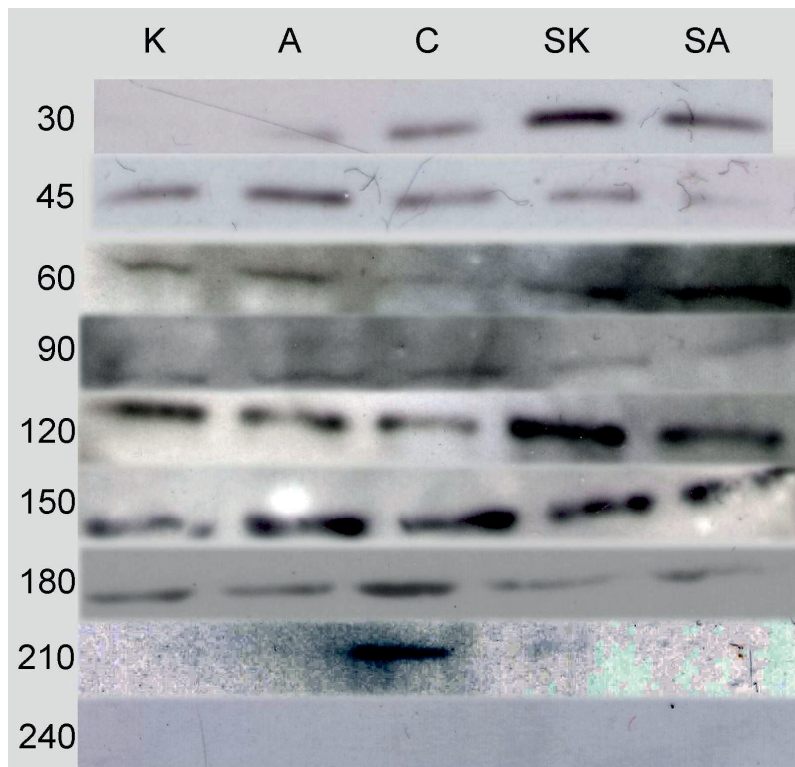


Abb. 3.4.2.2 Expression von LIS in HL-1 Zellen im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. HL-1 Zellen wurden mit jeweils 10 nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10 nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, und die Proteinkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Zum Expressionsnachweis wurde ein monoklonaler Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, der zur Erzeugung eines Bildes gescannt wurde. Die Expression von LIS ist in allen Proben nach 120 und 150 Minuten am stärksten, dabei ergeben sich teilweise erhebliche Unterschiede in der Signalstärke im Vergleich der verschiedenen Proben.

Nach 30 Minuten Inkubationszeit kann für die Expression von LIS in der Kontrolle kein Signal detektiert werden. Die Aldosteronprobe und Corticosteronprobe zeigen ein schwaches Signal, die Kombinationsprobe liegt in ihrer Intensität noch etwas darüber. Die Spironolactonkontrolle zeigt ein deutlich stärkeres Signal als alle anderen Proben. Nach 45 Minuten Inkubationszeit zeigen die Proben mehr Ähnlichkeit miteinander. Während die Kontrolle, die Corticosteronprobe und die Spironolactonkontrolle eine gleich hohe Intensität aufweisen, ist das Signal in der Aldosteronprobe etwas stärker, in der Kombinationsprobe hingegen etwas schwächer als die anderen Proben. Nach 60 Minuten hat die Expression in der Kontrolle, der Aldosteronprobe und auch in der Corticosteronprobe nachgelassen. Die beiden Spironolactonproben zeigen etwas intensivere Signale, liegen aber auch auf einem

3. ERGEBNISSE

niedrigen Niveau. Nach 90 Minuten hat sich die Intensität in der Kontrolle, der Aldosteronprobe und der Corticosteronprobe nicht verändert. Die beiden Spironolactonproben liegen diesmal in ihrer Intensität unter den anderen Proben. Nach 120 Minuten ist das Expressionsniveau insgesamt stärker, die stärksten Signale werden dabei in den Kontrollen beobachtet, wobei die Spironolactonkontrolle noch leicht über der Kontrolle liegt. Die Aldosteronprobe und Corticosteronprobe zeigen die gleiche Intensität, die Kombinationsprobe liegt nur geringfügig darüber. Nach 150 Minuten ergibt sich ein anderes Bild. Die Intensität in der Aldosteronprobe und der Corticosteronprobe ist gestiegen und liegt nun über der Signalstärke der Kontrollen, deren Intensität leicht abgenommen hat. Die Kombinationsprobe liegt nunmehr in gleicher Signalstärke wie die Spironolactonkontrolle vor. Nach 180 Minuten ist die Expression in allen Proben gesunken, in der Corticosteronprobe ist das Signal etwas höher, die übrigen Proben liegen auf gleichem Niveau. Nach 200 Minuten hat die Expression noch weiter nachgelassen, ein Signal kann nur noch für die Corticosteronprobe beobachtet werden, aber auch dieses Signal nicht nur schwach über den Hintergrund. Nach 240 Minuten wiederum kann in keiner der Proben ein Signal für die Expression von LIS detektiert werden.

3.4.2.3 Expression von Beta-Aktin in HL-1 Zellen

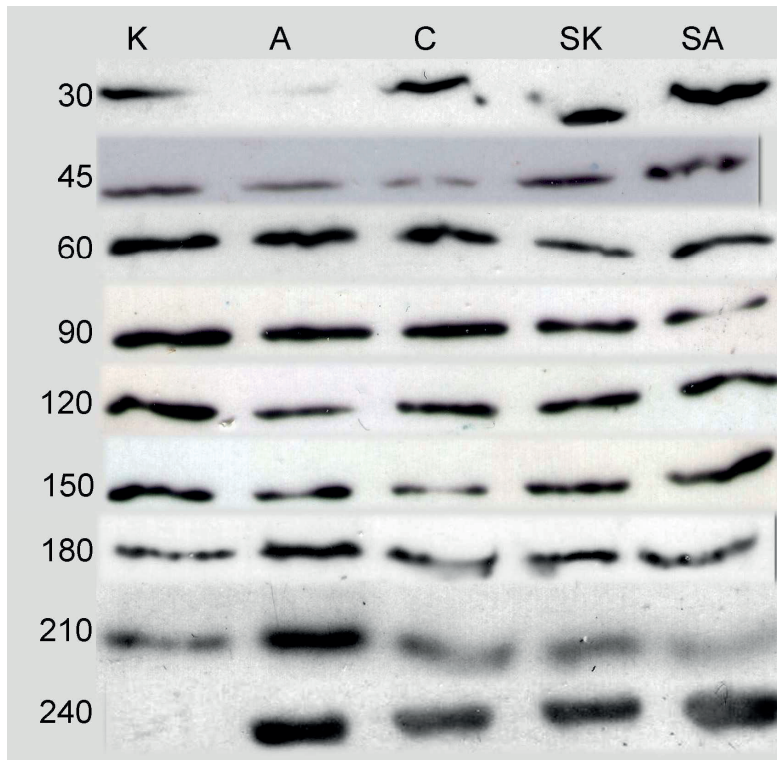


Abb. 3.4.2.3 Expression von Beta-Aktin in HL-1 Zellen Im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. HL-1 Zellen wurden mit jeweils 10 nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, und die Proteinkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Zum Expressionsnachweis wurde ein monoklonaler Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, der zur Erzeugung eines Bildes gescannt wurde. Die Expression von Beta-Aktin ist in HL-1 Zellen zwischen 60 und 150 Minuten Inkubationszeit verhältnismäßig stabil.

Die Expression von Beta-Aktin liegt nach 30 Minuten auf dem gleichen Niveau für die Kontrolle, die Corticosteronprobe, sowie die beiden Spironolactonkontrollen. Lediglich das Signal in der Aldosteronprobe liegt deutlich niedriger. Nach 45 Minuten hat sich die Signalstärke weitgehend angeglichen, in der Aldosteronprobe ist die Expression leicht höher, in der Kontrolle und der Corticosteronprobe etwas niedriger als zum vorherigen Zeitpunkt. Auch in den beiden Spironolactonproben liegt die Expression niedriger, bleibt dabei aber oberhalb der anderen Proben. Nach 60 Minuten ist die Expression in der Kontrolle, der Aldosteronprobe und der Corticosteronprobe wieder gestiegen, während sie für die Spironolactonkontrolle noch abgesunken ist. Auch die Kombinationsprobe liegt leicht unter

3. ERGEBNISSE

dem vorherigen Wert, dabei jedoch noch etwas über der Spironolactonkontrolle. Nach 90 Minuten liegt wiederum das gleiche Niveau für die Kontrolle, die Aldosteronprobe und die Corticosteronprobe vor. Sie sind in ihrer Intensität gleich geblieben, während die Spironolactonkontrolle leicht über dem Wert nach 60 Minuten liegt und der Wert in der Kombinationsprobe gegenüber dem vorherigen Zeitpunkt noch leicht abgesunken ist. Auch zu den folgenden Inkubationszeiten ergeben sich nur geringe Schwankungen. Das Expressionsniveau bleibt bis zum Zeitpunkt von 180 Minuten insgesamt auf gleichem Niveau, wobei im Wechsel einzelne Proben jeweils leicht abweichen. Nach 210 Minuten ist das Expressionsniveau in allen Proben deutlich höher, das stärkste Signal findet sich in der Aldosteronprobe. Nach 240 Minuten schließlich kann in der Kontrolle kein Signal beobachtet werden. Die Corticosteronprobe und die Spironolactonkontrolle zeigen Expression auf gleichem Niveau, die Aldosteronprobe und die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron liegen in ihrer Intensität deutlich darüber.

3.4.3 Expression der Kandidaten in HCT116-Zellen

Die HCT116 Zellen zeigten von allen verwendeten Zelllinien die stärkste Proliferation. Die Ausbeute bei der Proteinpräparation war am höchsten, so dass die Proteinkonzentration auf 2 µg/µl eingestellt werden konnte. Auch für die HCT116 Zellen wurden je 10 µg Protein pro Spur eingesetzt.

3.4.3.1 Expression von GAPDH in HCT116 Zellen

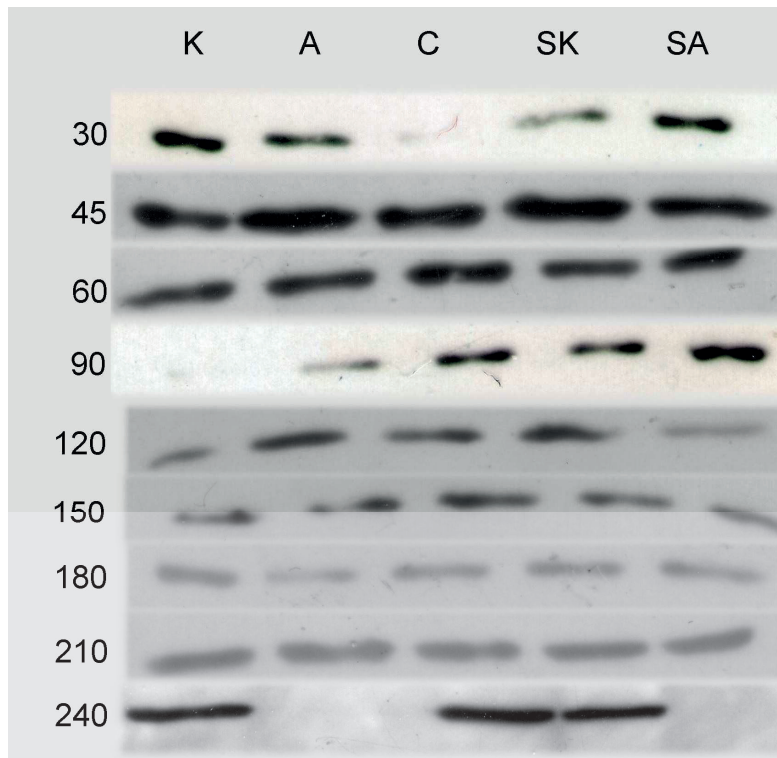


Abb. 3.4.3.1 Expression von GAPDH in HCT 116 Zellen im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. HCT116-Zellen wurden mit jeweils 10 nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, und die Proteinkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Für den Immunonachweis wurde der monoklonaler Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, der zur Erzeugung eines Bildes gescannt wurde. Auch hier sind die dynamischen Schwankungen geringer als in den Fibroblasten, es gibt jedoch Zeiten, zu denen in einzelnen Proben keine Expression nachweisbar ist.

In den HCT 116-Zellen ist die Expression von GAPDH nach 30 Minuten in der Kontrolle und der Kombinationsprobe am stärksten. Die Signalstärke in der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle liegt auf gleichem Niveau leicht darunter. In der Corticosteronprobe ist nur ein sehr schwaches Signal zu beobachten. Nach 45 Minuten ist die Expression in allen Proben gestiegen, in der Intensität ergeben sich leichte Verschiebungen. So liegt die Signalstärke in der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle leicht oberhalb der

3. ERGEBNISSE

anderen Proben. Nach 60 Minuten liegen die Proben insgesamt auf gleichem Niveau, leicht unterhalb des vorherigen Wertes. Nach 90 Minuten liegt die Expression in allen Proben auf einem deutlich niedrigeren Niveau. In der Kontrolle ist nur ein sehr schwaches Signal zu beobachten, die Aldosteronprobe liegt etwas stärker vor. Die Corticosteronprobe und Spironolactonkontrolle liegen in gleicher Signalstärke etwas intensiver als die Aldosteronprobe vor, das stärkste Signal findet sich in der Kombinationsprobe. Nach 120 Minuten ist die Expression insgesamt auf dem gleichen Niveau geblieben, innerhalb der Proben haben sich dabei Verschiebungen ergeben. So liegt das Signal in der Aldosteronprobe ungefähr auf dem gleichen Niveau wie die Spironolactonkontrolle, die übrigen Werte liegen leicht darunter. Nach 150 Minuten haben sich die Proben weiter einander angeglichen, im Expressionsniveau gibt es keine Unterschiede zum vorherigen Wert. Auch für 180 Minuten bleibt die Signalintensität der Proben sowohl auf gleichem Niveau als auch nah beieinander. Nach 210 Minuten ist die Expression in allen Proben gestiegen, dabei zeigen alle Proben die gleiche Signalstärke. Nach 240 Minuten gibt es deutlich intensivere Signale für die Kontrolle, die Corticosteronprobe und die Spironolactonkontrolle. Weder in der Aldosteronprobe noch in der Kombinationsprobe kann dagegen ein Signal beobachtet werden.

3.4.3.2 Expression von LIS in HCT116 Zellen

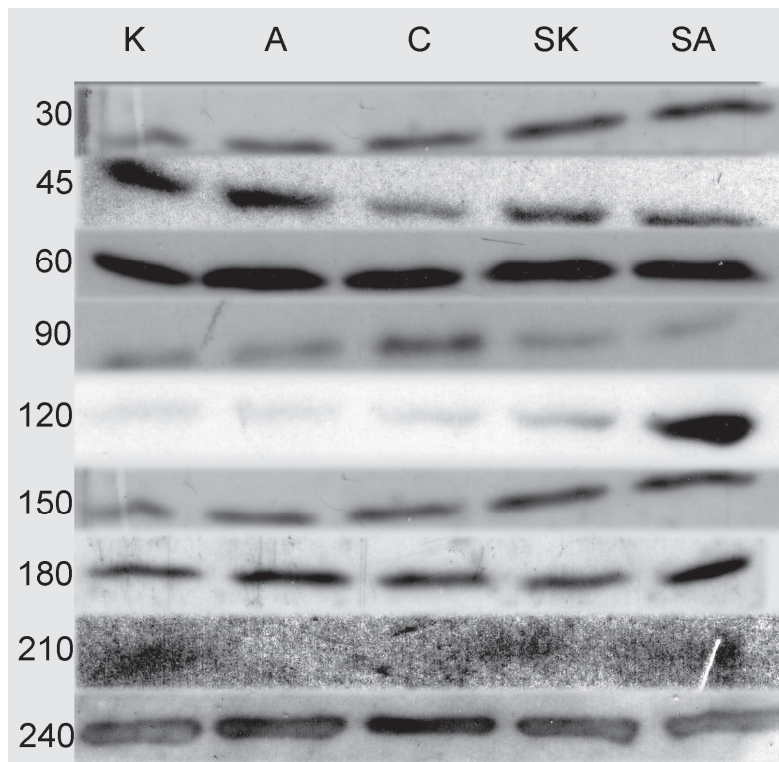


Abb. 3.4.3.2 Expression von LIS in HCT116 Zellen im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. HCT116-Zellen wurden mit jeweils 10 nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, und die Proteinkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Zum Expressionsnachweis wurde ein monoklonaler Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, zur Erzeugung eines Bildes wurde der Film gescannt. In den Inkubationszeiten bis 60 Minuten ist die Expression in allen Proben deutlich nachweisbar, danach wird sie in allen Proben zunächst schwächer (90-150 min) und steigt danach wieder an. Nach 210 Minuten sind die Signale in allen Proben knapp an der Nachweisgrenze.

Die Expression von LIS liegt nach 30 Minuten auf dem gleichen Niveau für alle Proben. Nach 45 Minuten ergeben sich erste Unterschiede. In der Kontrolle und auch der Aldosteronprobe ist das Signal stärker geworden, die Corticosteronprobe liegt leicht unterhalb des vorherigen Wertes, während die Spironolactonproben auf dem gleichen Niveau verblieben sind. Nach 60 Minuten zeigen alle Proben eine höhere Signalintensität. Dabei liegt das Signal in der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle leicht oberhalb der anderen Proben. Nach 90 Minuten ist die Expression in allen Proben deutlich schwächer, die Corticosteronprobe liegt dabei in ihrer Intensität leicht oberhalb der anderen Proben. Nach 120 Minuten wiederum ist die Expression in den meisten Proben abgesunken und die Signale sind nur

3. ERGEBNISSE

schwach zu beobachten. Lediglich die Kombinationsprobe weist ein starkes Signal auf. Nach 150 Minuten liegen die Proben auf gleichem Niveau vor, die Signalstärke in der Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron hat abgenommen, während die Expression in den anderen Proben stärker geworden ist. Auch nach 180 Minuten liegen die Proben weitgehend auf einem Niveau, dabei zeigen die Signale eine etwas stärkere Intensität als nach 150 Minuten. Nach 210 Minuten ist die Expression in allen Proben deutlich abgesunken. Für die Aldosteronprobe und die Corticosteronprobe ist kein Signal detektierbar, aber auch für die anderen Proben liegt das Signal kaum über den Hintergrund. Nach 240 Minuten wiederum findet sich in allen Proben eine gleichmäßige Expression auf hohem Niveau.

3.4.3.3 Expression von Beta-Aktin in HCT116 Zellen

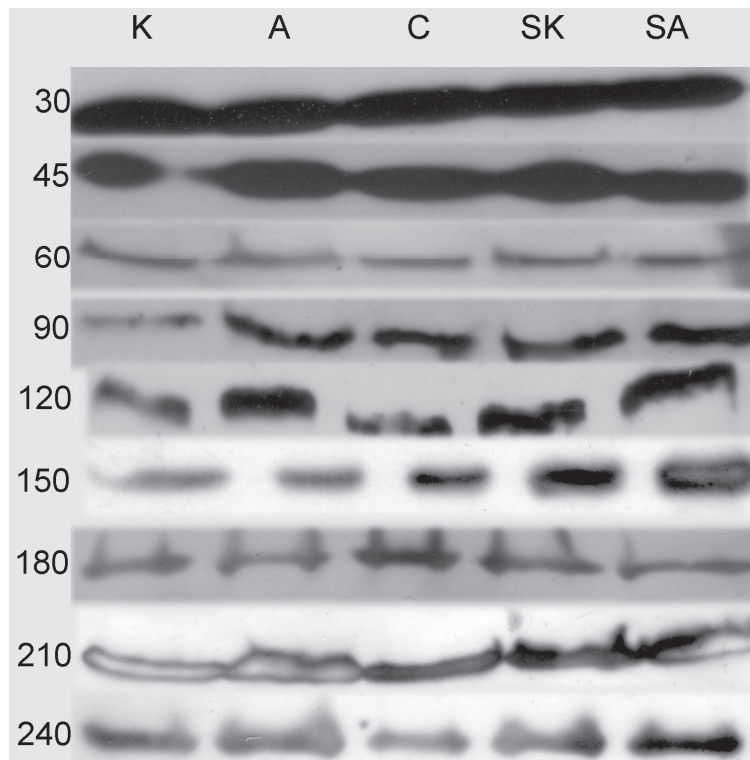


Abb. 3.4.3.3 Expression von Beta-Aktin in HCT 116 Zellen im Inkubationszeitraum von 30 bis 240 Minuten. HCT116-Zellen wurden mit jeweils 10 nM Aldosteron (A) oder Corticosteron (C), bzw. zur Kontrolle (K) mit dem gleichen Volumen Ethanol inkubiert. Spironolactonproben wurden mit 10nM Spironolacton für 30 Minuten präinkubiert, bevor ihnen 10nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde eine Proteinpräparation durchgeführt, und die Proteinkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Je 10 µg Protein wurden auf 15 % SDS-Polyacrylamid-gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen geblottet. Zum Expressionsnachweis wurde ein monoklonaler Antikörper in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit ECL auf einen Röntgenfilm, zur Erzeugung eines Bildes wurde der Film gescannt. Beta-Aktin ist zunächst in allen Proben stark exprimiert, nach 60 Minuten werden die Signale in allen Proben deutlich schwächer.

Die Expression von Beta-Aktin in HCT 116 Zellen liegt zunächst auf einem sehr hohen Niveau, dabei sind nach 30 Minuten keine Unterschiede in der Expression zwischen den Proben zu sehen. Auch nach 45 Minuten liegt die Expression in allen Proben hoch, dabei ist der Wert der Kontrolle und der Corticosteronprobe leicht niedriger als in der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle. Auch nach 60 Minuten liegt die Expression zwischen den Proben auf gleichem Niveau, allerdings liegt das Expressionsniveau deutlich unterhalb der Werte, die zuvor erzielt worden. Nach 90 Minuten zeigt die Kontrolle noch die gleiche Expression, während in allen anderen Proben Signale stärker geworden sind. Nach 120 Minuten hat die Expression in allen Proben leicht zugenommen, dabei ergeben sich nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. So liegen die Aldosteronprobe und

3. ERGEBNISSE

auch die beiden Spironolactonproben in leicht stärkerer Intensität vor als die Kontrolle und die Corticosteronprobe. Nach 150 Minuten liegt die Expression noch auf dem gleichen Niveau, diesmal sind die Signale in der Corticosteronprobe und den beiden Spironolactonproben etwas höher als die anderen Proben. Auch im weiteren Verlauf liegen die Proben jeweils auf dem gleichen Niveau und unterscheiden sich nur geringfügig.

4. Diskussion

4.1. Allgemeine Anmerkungen zur Aldosteronwirkung und zum Versuchsaufbau

Die deutlicher werdende Bedeutung des Aldosterons in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz fordert bessere Erkenntnisse der Wirkungsweise und Regulation im Herzen. Bisher sind noch viele Aspekte der Aldosteronwirkung, besonders im Bereich der Effekte, die nicht über den MR vermittelt werden, unverstanden.

Es gibt eine Vielzahl von Mechanismen, über die Aldosteron zur Mortalität bei Herzinsuffizienz beitragen könnte. Während man vor allem auf der *in vitro* Ebene schon einige Details (einbezogene Signalkaskaden, sekundäre Messenger) dieser Pathophysiologie erklären kann (Haseroth *et al.*, 1999) sind die genauen Stoffwechselwege, vor allem unter Berücksichtigung der Veränderung des Proteoms noch nicht verstanden. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die bei Herzkrankheiten häufig auftretenden Fibrosen nicht nur auf das Auffüllen von abgestorbenem Gewebe mit Fibroblasten zurückzuführen sind, sondern dass die Bildung von Fibrosen durch Aldosteron direkt begünstigt wird (Brilla *et al.*, 1993a, b; Zhou *et al.*, 1996). Dabei werden die Aldosteron-Effekte sowohl über den MR (Beggah *et al.*, 2002; Brilla *et al.*, 1993b) als auch unabhängig vom MR vermittelt (Rossol-Haseroth *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2000).

In früheren Arbeiten mit der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* konnte mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und differentieller Analyse eine Reihe von Proteinsignalen gefunden werden, deren Intensität zum Teil aufgrund eines allgemeinen Steroideffekts, zum Teil jedoch spezifisch durch Aldosteron variiert. Bisher konnten durch massenspektrometrischen Methoden in 13 der durch Aldosteron in ihrer Intensität veränderten Spots die verantwortlichen Proteine erfolgreich identifiziert werden (Böhmer, 2006).

Das Ziel dieser neuen Untersuchung war es, eine Reihe von vielversprechenden Kandidaten, die in dem Modellsystem Spaltheife als Aldosteron-beeinflusst identifiziert wurden, in den Mammaliersystemen Mensch, Ratte und Maus zu validieren. Die Untersuchung erfolgte hierbei auf zwei Ebenen.

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) wurden die Veränderungen der RNA-Synthese detektiert. Ergänzend dazu wurden mit Western Blot Analysen Unterschiede auf Proteinebene abgebildet.

Vergleichenden Untersuchungen auf RNA-Ebene wurden für GAPDH, Beta-Aktin, IPP, LIS, FKBP und PPIase durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 30, 45 und 60 Minuten präpariert, danach halbstündlich bis zur längsten Inkubationszeit von vier Stunden.

Die Untersuchung auf Proteinebene erfolgte mit parallelen Proben zu den gleichen Inkubationszeiten, allerdings ohne die Kandidaten PPIase und FKBP. Für PPIase war kein spezifischer Antikörper erhältlich, während der freundlicherweise von der Arbeitsgruppe

4. DISKUSSION

Fischer zu Verfügung gestellte Antikörper gegen FKBP aus Kaninchenserum mit den verwendeten Proben nicht reagierte.

4.2. Die Expression der Kandidaten in den unterschiedlichen Zellsystemen

Bei der Betrachtung der Expressionsdaten in den unterschiedlichen Zellsystemen und über den Zeitverlauf von insgesamt vier Stunden fällt zunächst ins Auge, dass die Daten zu den einzelnen Beobachtungszeitpunkten einer starken Schwankung unterliegen. Zur Interpretation sollen zunächst lediglich die statistisch signifikanten Daten herangezogen werden. Im ersten Schritt wurden dazu die Datensätze selektiert, in denen sich der Wert der Aldosteronprobe statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den Kontrollen unterscheidet. Diese Auswahl ergibt 21 Datensätze für die primären Fibroblasten. Die Tumorzelllinien ergeben mehr Datensätze mit Unterschieden zwischen den Kontrollen und den Aldosteronproben, für die HL-1 Zellen liegen signifikante Unterschiede in 30 Datensätzen und für die HCT 116 Zellen in 34 Datensätzen vor.

Tab. 4.2.1 Verteilung der Datensätze mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen Aldosteron und der Kontrolle auf die Kandidatengene in den verschiedenen Zellkultursystemen.

	Fibroblasten	%	HL-1	%	HCT 116	%
GAPDH	4	19,05	7	23,33	6	17,75
Beta-Aktin	3	14,29	3	10,00	6	17,75
IPP	3	14,29	7	23,33	4	11,75
LIS	3	14,29	4	13,33	4	11,75
FKBP	5	23,81	5	16,67	8	23,53
PPlase	3	14,29	4	13,33	6	17,75
gesamt	21		30		34	

Dabei unterscheidet sich die Verteilung auf die betrachteten Kandidaten in den verschiedenen Zellkultursystemen leicht voneinander (vgl. Tab. 4.1). Für die HCT 116 Zellen ergibt sich der gleiche Anteil für GAPDH, Beta-Aktin und PPlase, FKBP ist leicht überrepräsentiert, während LIS und IPP mit 12% der Datensätze den geringsten Anteil zeigen. In den HL-1 Zellen liegt der Schwerpunkt auf GAPDH und IPP, Beta-Aktin zeigt den geringsten Anteil. In den Fibroblasten gibt es die gleiche Anzahl an unterschiedlichen Datensätzen für Beta-Aktin, IPP, Lis und PPlase, GAPDH und FKBP zeigen hier den größten Anteil.

4. DISKUSSION

Da die verwendeten Zellen im Gegensatz zur Spalthefe über den Mineralocorticoidrezeptor verfügen, sollen die selektierten Datensätze in Bezug auf die Spironolactonproben mit und ohne Aldosteronzusatz verglichen werden. Hier gibt es drei verschiedene Möglichkeiten.

Gibt es keine Unterschiede zwischen den beiden Spironolactonproben, so deutet das darauf hin, dass der beobachtete Effekt in den Aldosteronproben zumindest zum größten Teil über den MR vermittelt wird. Unterschiede zwischen den Proben können den gleichen Effekt (induziert/ reprimiert) darstellen wie in den Aldosteronproben oder in die entgegengesetzte Richtung zeigen.

Die Tabellen 4.2.2 bis 4.2.4 geben einen Überblick über die durch Aldosteron beeinflussten Kandidaten in den verschiedenen Zellkultursystemen. Für alle Datensätze wurde zunächst mit der Levene-Statistik die Homogenität der Varianzen zwischen den Gruppen verglichen. Bei gleichen Varianzen wurden ein LSD-Test und eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Unterschieden sich die Varianzen, so kamen der Tamhane- und der Dunnett-Test zur Anwendung. Der p -Wert in der Tabelle gibt dabei jeweils den höheren Wert der beiden durchgeführten Tests an. In der letzten Spalte erfolgt die Einteilung in Bezug auf das Verhalten der Spironolactonproben untereinander. Tritt der gleiche Effekt auf wie beim Aldosteron, so ist der Eintrag fettgedruckt.

4. DISKUSSION

Tab. 4.2.2 Datensätze mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Aldosteronproben und den Kontrollen für primäre Fibroblasten.

Gen	Zeit	p-Wert	Tests	Effekte nach Spironolacton
GAPDH	60	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
GAPDH	150	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
GAPDH	180	0,02	°°	Nach Spironolacton Umkehrung der Reaktion
GAPDH	210	0,009	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
Beta-Aktin	60	≤0,001	**	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
Beta-Aktin	90	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
Beta-Aktin	150	0,035	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
IPP	90	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton
IPP	120	0,01	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
IPP	150	0,01	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
LIS	60	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
LIS	90	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
LIS	150	0,02	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
FKBP	60	≤0,001	**	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
FKBP	90	0,13	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	120	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	240	0,029	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
PPlase	45	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton
PPlase	60	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
PPlase	90	0,01	**	Kein Effekt nach Spironolacton
PPlase	120	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton

** Homogenität der Varianzen, es wurden ein LSD-Test und eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

°° keine Homogenität der Varianzen, es wurden ein Tamhane-Test und ein Dunnett-Test durchgeführt.

4. DISKUSSION

Tab. 4.2.3 Datensätze mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Aldosteronproben und den Kontrollen für HL-1 Zellen.

Gen	Zeit	p-Wert	Tests	Effekte nach Spironolacton
GAPDH	30	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
GAPDH	45	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
GAPDH	90	0,002	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
GAPDH	120	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
GAPDH	150	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
GAPDH	180	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
GAPDH	240	0,048	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
Beta-Aktin	90	0,004	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
Beta-Aktin	150	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
Beta-Aktin	180	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
IPP	45	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton
IPP	60	0,025	**	Kein Effekt nach Spironolacton
IPP	90	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
IPP	120	0,07	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
IPP	150	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
IPP	180	0,03	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
IPP	240	0,04	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
LIS	45	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
LIS	60	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
LIS	90	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
LIS	180	0,037	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
FKBP	30	≤0,001	**	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
FKBP	45	≤0,001	**	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
FKBP	120	0,04	**	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	150	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	180	0,003	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
PPlase	45	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
PPlase	90	0,01	**	Kein Effekt nach Spironolacton
PPlase	180	0,01	**	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
PPlase	240	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton

** Homogenität der Varianzen, es wurden ein LSD-Test und eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

°° keine Homogenität der Varianzen, es wurden ein Tamhane-Test und ein Dunnett-Test durchgeführt.

4. DISKUSSION

Tab. 4.2.4 Datensätze mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Aldosteronproben und den Kontrollen für HCT 116 Zellen.

Gen	Zeit	p-Wert	Tests	Effekte nach Spironolacton
GAPDH	30	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
GAPDH	45	≤0,001	**	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
GAPDH	60	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
GAPDH	90	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
GAPDH	150	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
GAPDH	240	0,002	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
Beta-Aktin	60	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
Beta-Aktin	90	0,05	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
Beta-Aktin	120	0,024	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
Beta-Aktin	150	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton
Beta-Aktin	180	0,016	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
Beta-Aktin	240	0,029	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
IPP	60	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
IPP	90	0,18	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
IPP	120	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
IPP	240	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
LIS	45	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
LIS	120	≤0,001	**	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
LIS	150	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
LIS	180	0,004	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
FKBP	30	≤0,001	**	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	45	≤0,001	**	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
FKBP	60	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
FKBP	90	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	120	0,004	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	150	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
FKBP	180	0,013	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
FKBP	210	0,003	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
PPlase	30	0,006	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
PPlase	45	0,003	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
PPlase	60	≤0,001	°°	Nach Spironolacton Umkehr der Reaktion
PPlase	90	≤0,001	°°	Kein Effekt nach Spironolacton
PPlase	150	≤0,001	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton
PPlase	210	0,009	°°	Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton

** Homogenität der Varianzen, es wurden ein LSD-Test und eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

°° keine Homogenität der Varianzen, es wurden ein Tamhane-Test und ein Dunnett-Test durchgeführt.

4. DISKUSSION

Vergleicht man die Verteilung der Daten zu den verschiedenen Zelllinien erneut, so zeigt sich, dass der Anteil an Fällen, in denen der beobachtete Aldosteroneffekt auch nach Spironolacton auftritt, für alle Zelllinien ungefähr gleich hoch liegt (Tab. 4.2.5). In der Verteilung auf die einzelnen Kandidaten ergeben sich jedoch deutliche Unterschiede. Während z. B. für die Fibroblasten die beobachteten Effekte für GAPDH in 50 % der Fälle auch nach der Behandlung mit Spironolacton auftraten, konnte für HCT 116 Zellen diese Effekte nur in 33 % der Fälle bestätigt werden. Der Wert für Beta-Aktin liegt in allen Zellsystemen stabil bei 33 %. IPP wurde in Fibroblasten in 66 % der Fälle auch nach der Behandlung mit Spironolacton unterschiedlich exprimiert, auch die HL-1 Zellen weisen mit 43 % einen relativ hohen Wert auf. In den HCT 116 Zellen hingegen konnte für IPP in keinem der 6 Datensätze eine Beeinflussung durch Aldosteron nach der Spironolactongabe nachgewiesen werden.

Tab. 4.2.5 Verteilung der Datensätze mit statistisch signifikanten Unterschieden zwischen Aldosteron / Kontrolle auch nach Spironolactonbehandlung auf die Kandidatengene in den verschiedenen Zellkultursystemen.

Vergleich	Fibroblasten		%	HL-1		%	HCT 116		%
	SK↔SA	K↔A		SK↔SA	K↔A		SK↔SA	K↔A	
GAPDH	2	4	50	3	7	43	2	6	33
Beta-Aktin	1	3	33	1	3	33	2	6	33
IPP	2	3	66	3	7	43	0	4	0
LIS	2	3	66	1	4	25	2	4	50
FKBP	1	5	20	2	5	40	4	8	50
PPlase	1	4	25	1	4	25	3	6	50
gesamt	9	21	43	11	30	37	13	34	38

In den HL-1 Zellen und den Fibroblasten konnten verschiedene Datensätze für alle Kandidaten bestätigt werden. Im Folgenden sollen die einzelnen Daten genauer betrachtet und mit den Proteindaten verglichen werden.

4.2.1 Expressionsunterschiede in Fibroblasten

4.2.1.1 GAPDH

Für GAPDH konnten nach 60 Minuten und nach 150 Minuten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Aldosteronproben und den Kontrollen auch nach Spironolactonbehandlung nachgewiesen werden.

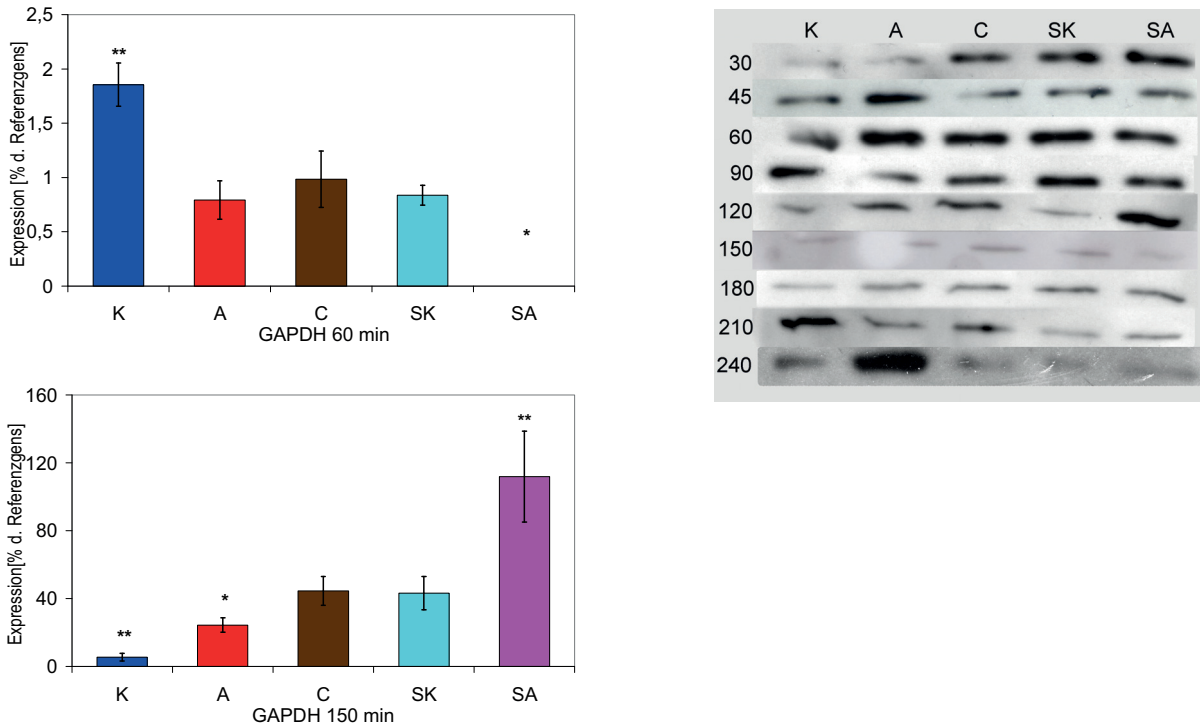


Abb. 4.2.1.1 Gegenüberstellung der Daten für GAPDH in Fibroblasten auf RNA- und Protein-Ebene. Fibroblasten wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In den Diagrammen der RT-PCR sind die statistischen Signifikanzen der Proben gekennzeichnet. Unterscheidet sich eine Probe statistisch signifikant von allen anderen, so ist die entsprechende Probe gekennzeichnet. Dabei liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**)

Zu beiden Zeitpunkten, zu denen sich Unterschiede im Expressionsprofil für GAPDH zeigen ließen, liegt die Expressionsrate auf einem sehr niedrigen Niveau. In der Kontrolle wurde nach 60 Minuten, gemessen am Referenzgen, nur knapp 2% der Expression gefunden. Der Wert für Aldosteron, Corticosteron und die Spironolactonkontrolle liegt statistisch signifikant darunter, in der Kombinationsprobe konnte keine Expression nachgewiesen werden. Auch nach 150 Minuten ist die Expression in der Kontrolle sehr niedrig. Zu diesem Zeitpunkt jedoch ist die Expression in allen anderen Proben höher als in der Kontrolle. Für beide Zeiten liegen die Werte in der Corticosteronprobe in einem vergleichbaren Bereich zur Aldosteronprobe, dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich um einen allgemeinen Steroideffekt handelt. Auffallend ist, dass zu beiden Zeitpunkten der Wert in der

4. DISKUSSION

Kombinationsprobe von den übrigen Proben abweicht. Nach 60 Minuten konnte keine Expression in der Kombinationsprobe nachgewiesen werden. Der Wert in der Aldosteronprobe liegt unter dem der Kontrolle, Spironolacton allein löst ebenfalls eine verringerte Expression aus. In der Kombination aus Spironolacton und Aldosteron scheinen sich diese Effekte zu summieren.

Nach 150 Minuten ist die Richtung der Reaktion entgegengesetzt, das Verhalten der einzelnen Proben zueinander bleibt jedoch konstant. In der Aldosteronprobe ist die Expression ebenso wie in der Corticosteronprobe und der Spironolactonkontrolle hochreguliert, in der Kombinationsprobe liegt wiederum ein noch höherer Wert vor. Dabei liegt die Expressionsrate mit 112% sogar über der Summe der Einzelwerte aus Spironolactonkontrolle (46%) und der Aldosteronprobe (25%). In der Proteinexpression spiegeln sich diese Unterschiede nicht wider. Auffallend ist jedoch, dass die Expression von GAPDH auch auf Proteinebene starken Schwankungen unterworfen ist. Nach 90 Minuten liegen die Signale in den Aldosteronproben jeweils leicht unter den Kontrollen, unterscheiden sich jedoch nicht voneinander. Nach 120 Minuten sind die Signale in den Aldosteronproben jedoch höher als in den Kontrollen, hierzu gibt es ebenfalls keine Entsprechung auf RNA-Ebene.

4.2.1.2 Beta-Aktin

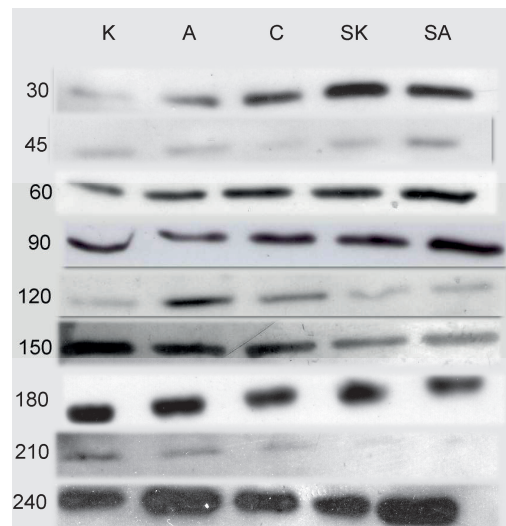
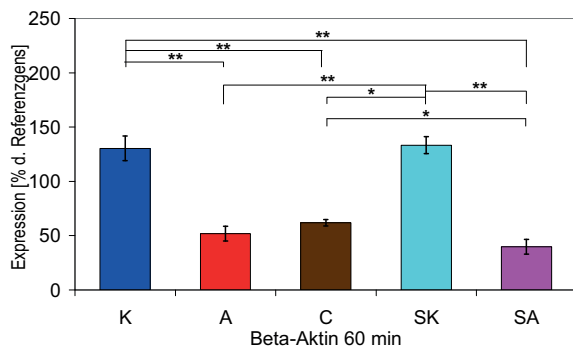


Abb. 4.2.1.2 Gegenüberstellung der Daten für Beta-Aktin in Fibroblasten auf RNA- und Protein-Ebene. Fibroblasten wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In dem Diagramm der RT-PCR sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**).

Für Beta-Aktin konnten nur zu einem Zeitpunkt statistisch signifikante Daten erzielt werden, in denen Aldosteron auch nach Spironolactonbehandlung zum gleichen Effekt führte. Hierbei

4. DISKUSSION

handelt es sich ebenfalls um den Untersuchungszeitpunkt von 60 Minuten, die Kontrolle und die Spironolactonkontrolle liegen dabei mit rund 130% oberhalb der Expression des Referenzgens. Spironolacton allein führt zu keiner Veränderung im Expressionsmuster von Beta-Aktin. Der Wert in der Kombinationsprobe liegt zwar leicht unterhalb der Werte in der Aldosteronprobe und der Corticosteronprobe, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant davon. Auch hier scheint es sich um einen eher generellen Steroideffekt zu handeln. Wie im Fall des GAPDH können die Unterschiede im Expressionsprofil auf der RNA-Ebene in der Proteinebene nicht bestätigt werden. Die Proteinexpression ist über die Zeit starken Schwankungen unterworfen, die Signalstärke innerhalb der Proben liegt dabei meist auf einem Niveau. Nach 120 Minuten ist das Signal in der Aldosteronprobe etwas stärker als in anderen Proben, im Expressionsprofil auf RNA-Ebene lassen sich diese Unterschiede nicht erkennen. Nach 240 Minuten ist das Signal in beiden Aldosteronproben gegenüber den Kontrollen erhöht, auch hierzu finden sich jedoch keine passenden RNA-Daten.

4.2.1.3 IPP

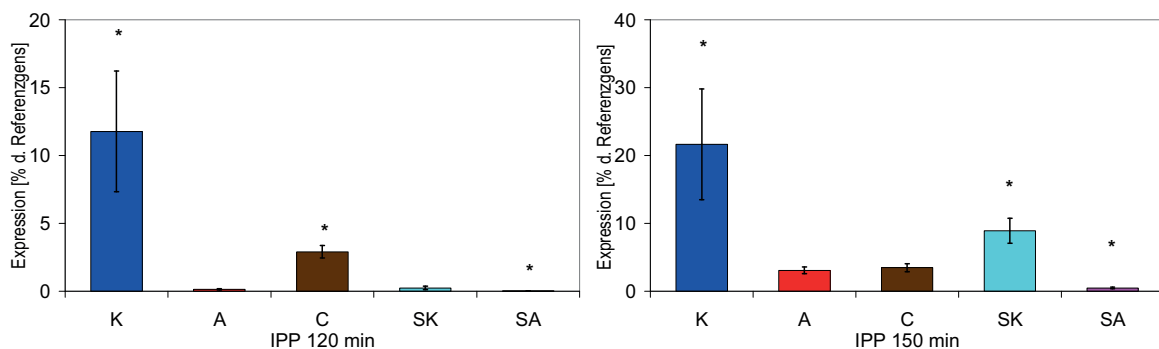


Abb. 4.2.1.3 Vergleich der IPP-Daten in Fibroblasten auf RNA-Ebene. Fibroblasten wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In den Diagrammen der RT-PCR sind die statistischen Signifikanzen der Proben gekennzeichnet. Unterscheidet sich eine Probe statistisch signifikant von allen anderen, so ist die entsprechende Probe gekennzeichnet. Dabei liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Sowohl nach 120 als auch nach 150 Minuten führt Aldosteron zu geringerer Expression im Vergleich zur Kontrolle.

In den Expressionsprofilen von IPP finden sich statistisch signifikante Daten nach 120 und 150 Minuten. Zu beiden Zeitpunkten ist die Expression auf einem sehr niedrigen Niveau, in der Kontrolle liegt der Wert bei 12%, bzw. 20% des Referenzgens. Dabei zeigt die Kontrolle für beide Zeiten den jeweils höchsten Wert. In der Spironolactonkontrolle liegt der Wert für beide Fälle darunter. Die Expression von IPP in der Corticosteronprobe liegt nach 120 Minuten über den Werten für die Aldosteronprobe und die Spironolactonkontrolle, nach 150

4. DISKUSSION

Minuten hingegen auf dem gleichen Niveau wie die Aldosteronprobe, aber unterhalb der Spironolactonkontrolle. Für beide Untersuchungszeitpunkte ist die Expression in der Kombinationsprobe am geringsten. Für IPP liegen keine Proteindaten vor, da die Western Blots keine Signale lieferten. Zumindest für die hier betrachteten Zeiten ließe sich dies durch die geringe Expression von IPP erklären.

4.2.1.4 LIS

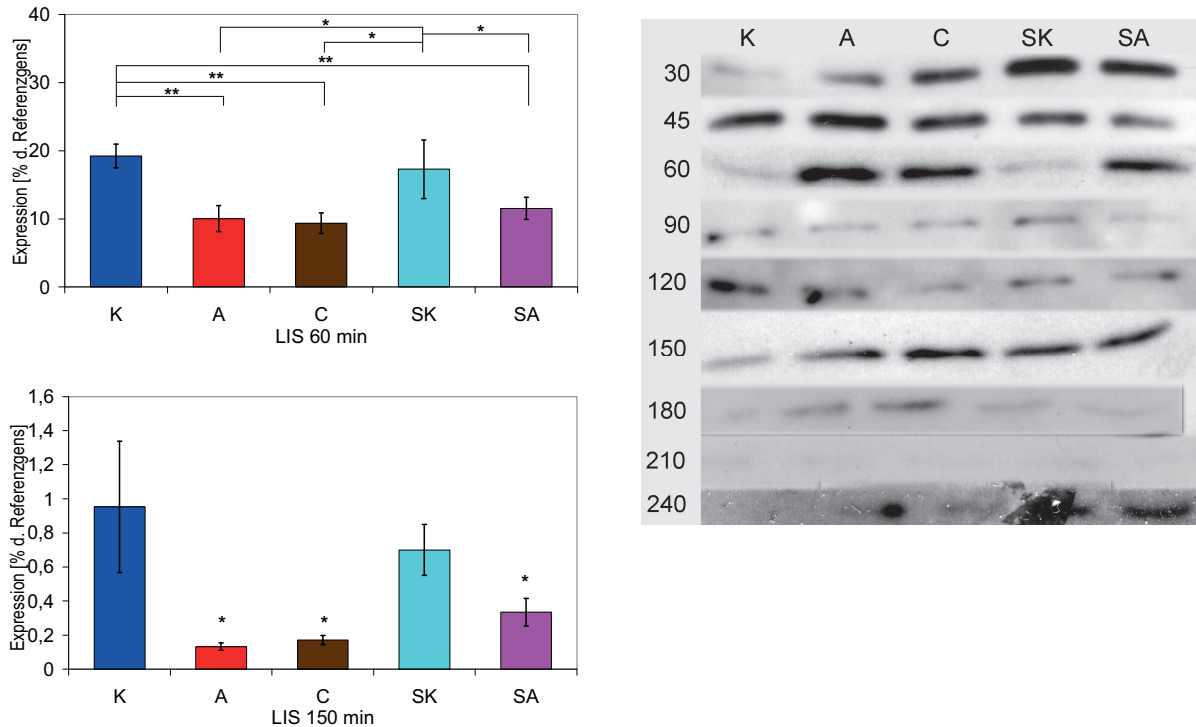


Abb. 4.2.1.4 Gegenüberstellung der Daten für LIS in Fibroblasten auf RNA- und Protein-Ebene. Fibroblasten wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In den Diagrammen der RT-PCR sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet.

Die Gegenüberstellung der Expressionsdaten für LIS in Fibroblasten ergibt nach 60 Minuten gegensätzliche Ergebnisse. Die Proteindaten führen ebenso wie die RNA-Daten zu gleichen Werten für jeweils die Kontrollen bzw. die übrigen Proben. Während jedoch auf RNA-Ebene die Werte für Aldosteron im Vergleich zu den Kontrollen abgesenkt sind, zeigen die Blots deutlich stärkere Werte für diese Proben. Die Proben für beide Experimente stammen aus parallel präparierten Schalen, die zum gleichen Zeitpunkt verarbeitet wurden. Eine mögliche

4. DISKUSSION

Interpretation liegt darin, dass es sich bei der erhöhten Expression auf RNA-Ebene bereits um einen Regulationsmechanismus der Zelle handelt.

Nach 150 Minuten liegen auf RNA-Ebene erneut geringere Expressionswerte für die Proben nach Steroidwirkung vor. Die Unterschiede zwischen den Proben finden sich auf Proteinebene nicht wieder, jedoch ist auffällig, dass die Signale in den Blots verhältnismäßig stark sind, während die Expressionswerte auf RNA-Ebene für alle Proben unterhalb 1 % des Referenzgens liegen. Die Kontrolle ist auf den Blots die Probe mit dem schwächsten Signal, während der Wert auf RNA-Ebene am höchsten ist.

4.2.1.5 FKBP & PPIase

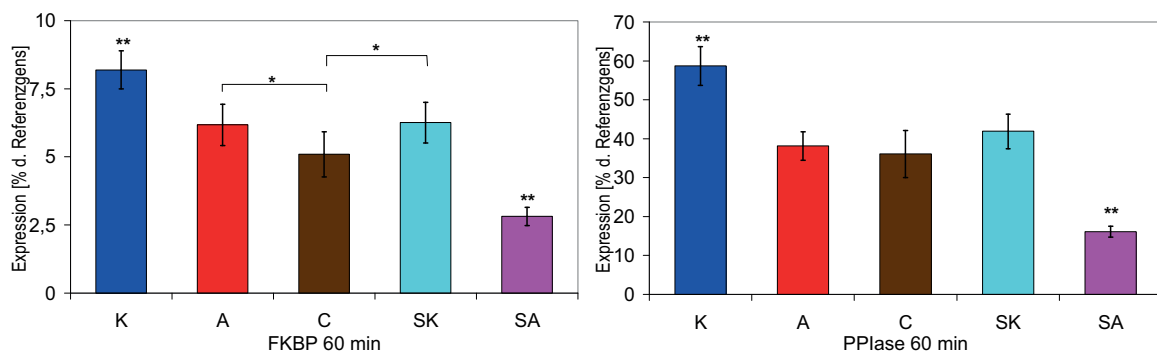


Abb. 4.2.1.5 Vergleich der Daten für FKBP und PPIase in Fibroblasten auf RNA-Ebene. Fibroblasten wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 µM Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In den Diagrammen der RT-PCR sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet. Sowohl für FKBP als auch für PPIase ist nach 60 Minuten die Expression in den Aldosteronproben im Vergleich zu den Kontrollen verringert. Auch Spironolacton verringert die Expression, in den Kombinationsproben (SA) summiert sich dieser Effekt.

Da für FKBP und PPIase keine Proteindaten vorliegen, sollen jeweils die Daten auf RNA-Ebene miteinander verglichen werden, da beide Proteine zur gleichen Enzymfamilie der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen gehören. Für die Fibroblasten ergeben sich für beide Proteine statistisch signifikante Daten nach 60 Minuten. In beiden Fällen ist die Expression in den Aldosteronproben geringer als in den entsprechenden Kontrollen. Die Expression in der Spironolactonkontrolle ist gegenüber der Kontrolle ebenfalls statistisch signifikant abgesenkt und liegt auf dem gleichen Niveau wie in den Aldosteron- und Corticosteronproben. In der Kombinationsprobe liegen die Werte jeweils signifikant unter den anderen Proben. Ebenso wie bei der Expression der GAPDH scheinen sich also in den Kombinationsproben die Effekte des Spironolactons und des Aldosterons zu addieren. Die Expressionsprofile für

4. DISKUSSION

FKBP sehen sich insgesamt sehr ähnlich und unterscheiden sich im Wesentlichen lediglich in der Expressionsstärke. Mit einer Expression unter 10% des Referenzgens ist FKBP dabei weniger repräsentiert als PPlase.

Zusammenfassend konnten für die primären Fibroblasten auf RNA-Ebene für alle Kandidaten Aldostereffekte unabhängig von der Spironolactonbehandlung validiert werden. Ein Schwerpunkt liegt bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten, hier konnten für fünf der sechs Kandidaten übereinstimmende Daten gefunden werden. Zu diesem Zeitpunkt führte die Inkubation mit Aldosteron durchweg zu verminderter Expression.

Für GAPDH konnte zu einem späteren Zeitpunkt eine erhöhte Expression nach Aldosteronbehandlung nachgewiesen werden. Auf die Expression von LIS und Beta-Aktin hat Spironolacton keinen Einfluss, für die anderen Kandidaten konnte eine veränderte Expression auch in der Spironolactonkontrolle beobachtet werden.

Die RNA- und Proteindaten korrelieren dabei kaum, übereinstimmende Veränderungen konnten nicht gefunden werden. Für die Expression von LIS gab es reziproke Daten.

Für alle Kandidaten schwankt die Signalstärke in den Western Blots bei den verschiedenen Inkubationszeiten und z. T. auch zwischen den Proben beachtlich. Ein Aldostereinfluss unabhängig von der Vorbehandlung mit Spironolacton lässt sich nicht eindeutig zeigen, Trends in gleichen Unterschieden zwischen Aldosteronproben und Kontrollen finden sich für GAPDH (90 und 120 Minuten), Beta-Aktin (240 Minuten) und LIS (60 Minuten).

4.2.2 Expressionsunterschiede in HL-1 Zellen

4.2.2.1 GAPDH

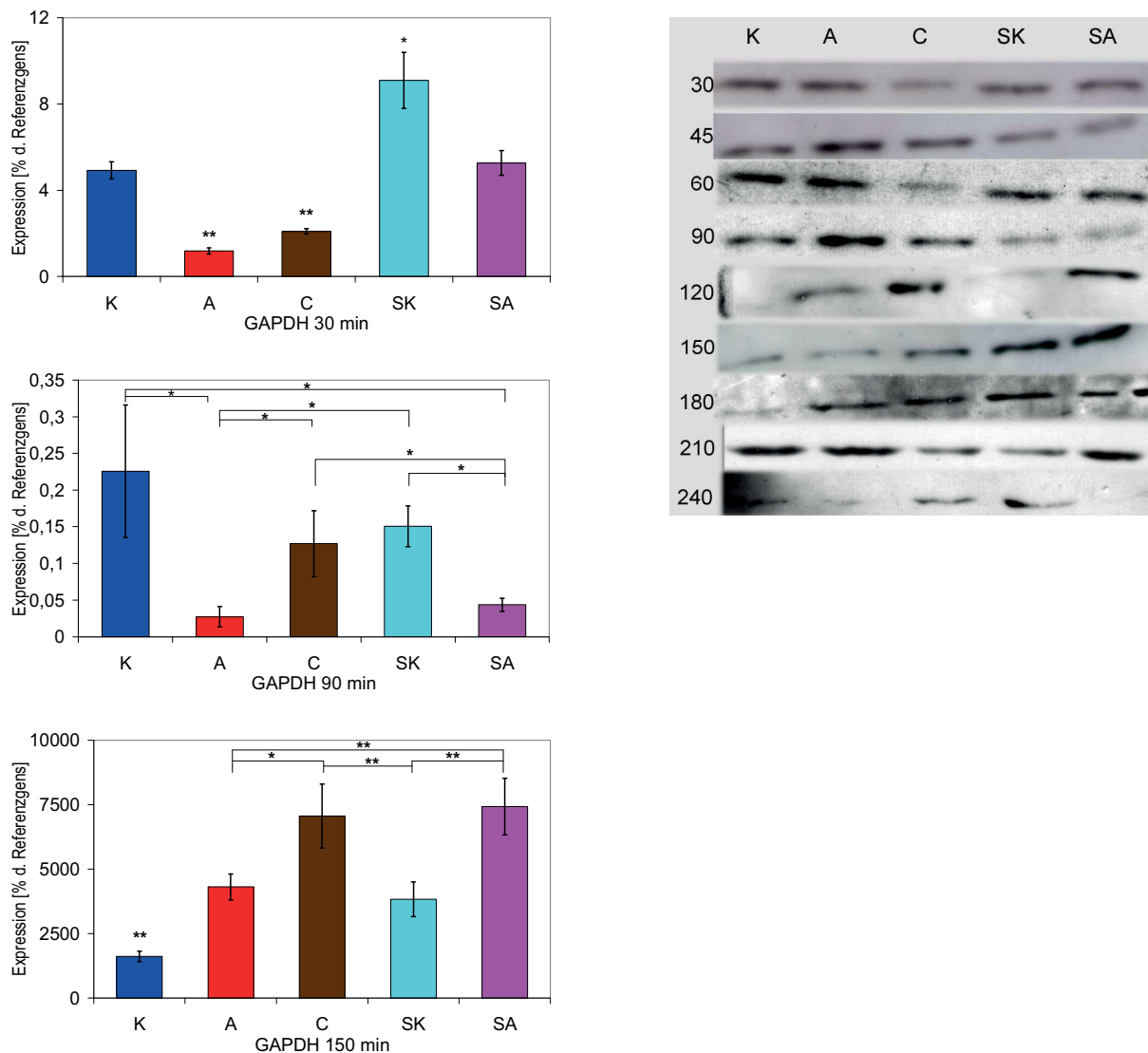


Abb. 4.2.2.1 Gegenüberstellung der Daten für GAPDH in HL-1 Zellen auf RNA- und Protein-Ebene. HL-1 Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In den Diagrammen der RT-PCR sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet. In HL-1 Zellen führt die Inkubation mit Aldosteron nach 60 und 90 Minuten zu verringerter Expression, nach 150 Minuten hingegen ist die Expression stärker als in den Kontrollen. Die Inkubation mit Spironolacton resultiert nur nach 150 Minuten in einer vergleichbaren Expression, in der Kombinationsprobe summieren sich beide Effekte.

In den HL-1 Zellen wurden für GAPDH drei verschiedene Zeitpunkte gefunden, zu denen es statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Aldosteronproben und den jeweiligen Kontrollen gibt. Nach 30 und 90 Minuten ist die Expression in den Aldosteronproben dabei jeweils reduziert. In beiden Fällen liegt die Expression sehr niedrig, die Kontrolle zeigt 5 %

4. DISKUSSION

Expression (30 min), bzw. <1 % Expression (90 min). Nach 30 Minuten ist die Expression in der Spironolactonkontrolle gegenüber der Kontrolle erhöht, dieser Unterschied findet sich auch im Vergleich der Aldosteronproben wieder. Die Kombinationsprobe liegt deutlich über der Aldosteronprobe, dieser Effekt des Spironolactons ist nach 90 Minuten nicht mehr zu beobachten, hier liegen die beiden Kontrollen ebenso wie die beiden Aldosteronproben jeweils auf einem Niveau. Nach 150 Minuten ist die Expression in den Aldosteronproben gegenüber den Kontrollen verstärkt, hier ist ebenfalls ein stimulierender Effekt des Spironolactons zu beobachten. Wenn sich auch die Einzelwerte voneinander unterscheiden, so gibt es dennoch Gemeinsamkeiten im Expressionsprofil der Fibroblasten und der HL-1 Zellen:

Beide zeigen eine geringe Expression von GAPDH bei kurzen Inkubationszeiten, wobei die Werte in den Aldosteronproben jeweils unterhalb der Werte der Kontrollen liegen. Nach längeren Inkubationszeiten kann ein stimulierender Effekt des Aldosterons beobachtet werden, gleiches trifft für das Spironolacton zu, in der Kombinationsprobe addieren sich diese Effekte.

Auch für die HL-1 Zellen gibt es keine direkten Übereinstimmungen der Daten auf RNA- und Proteinebene.

Erneut fallen die starken Schwankungen der Signale im Zeitverlauf und zwischen den Proben auf Proteinebene auf. Nach 90 Minuten ist das Signal in der Aldosteronprobe gegenüber der Kontrolle erhöht, hier findet sich jedoch keine Entsprechung in der Kombinationsprobe. Nach 120 Minuten sind die Signale insgesamt sehr schwach, beide Aldosteronproben liegen jedoch deutlich über den Kontrollen, das stärkste Signal zeigt jedoch die Corticosteronprobe.

4.2.2.2 Beta-Aktin

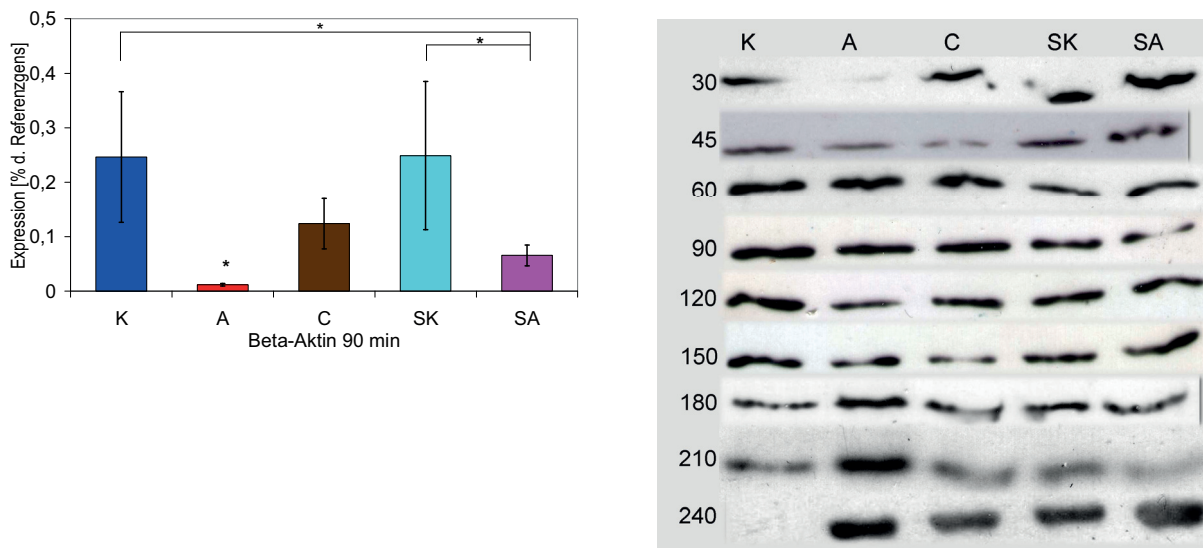


Abb. 4.2.2.2 Gegenüberstellung der Daten für Beta-Aktin in HL-1 Zellen auf RNA- und Protein-Ebene. HL-1 Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In RT-PCR-Diagramm sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet.

Für die Expression von Beta-Aktin konnten für einen Datensatz statistisch signifikante Unterschiede zwischen jeweils den Aldosteronproben und den Kontrollen gefunden werden. Es handelt sich um den Zeitpunkt von 90 Minuten, die Expression ist in allen Proben sehr gering (unter 1%). Dabei unterscheidet sich der Wert in der Corticosteronprobe nicht von den beiden Kontrollen, jedoch von beiden Aldosteronproben, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Reaktion spezifisch für Aldosteron ist. Die Proteindaten zum gleichen Inkubationszeitpunkt zeigen deutliche Banden in allen Proben, lediglich die Kombinationsprobe liefert ein etwas schwächeres Signal. Auch hier lassen sich also keine direkten Zusammenhänge zwischen den Daten auf RNA- Ebene und Proteinebene herstellen.

4.2.2.3 IPP

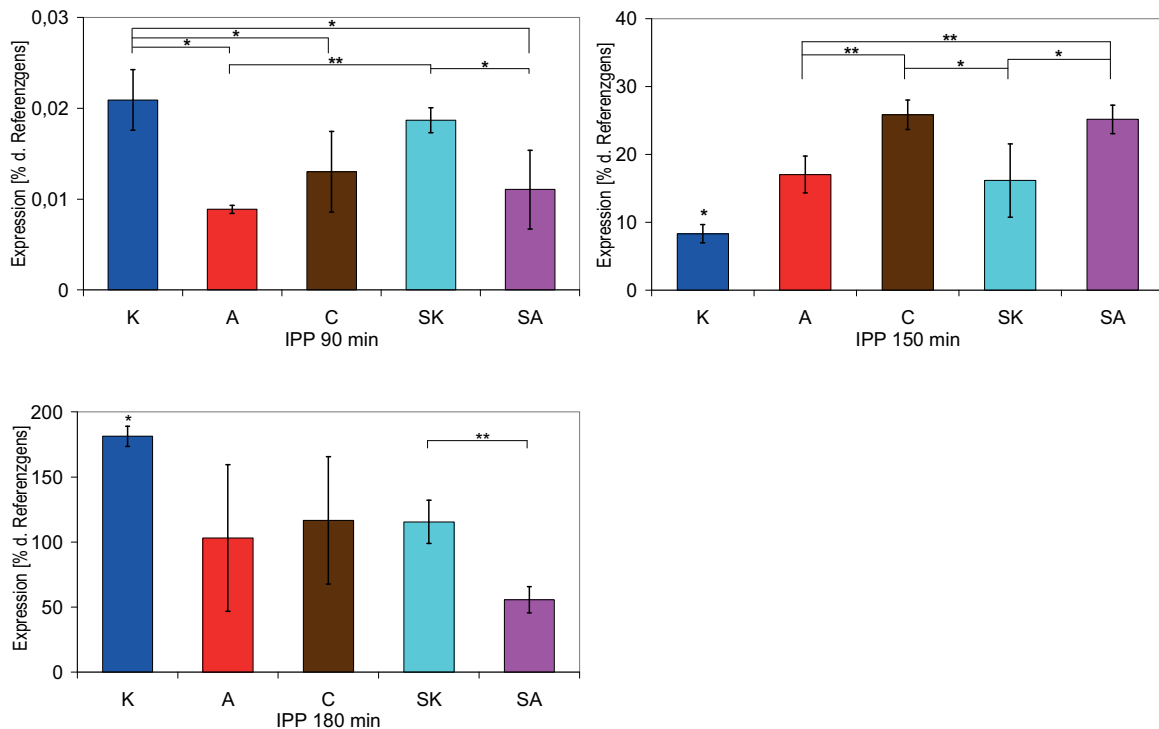


Abb. 4.2.2.3 Vergleich der IPP-Daten in HL-1 Zellen auf RNA-Ebene. HL-1 Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In RT-PCR-Diagramm sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet.

Für die Expression von IPP konnten drei verschiedene Inkubationszeiten bestimmt werden, zu denen die Expression in den Aldosteronproben statistisch signifikant von den Proben abweicht. Nach 90 Minuten sind die Signale in den Aldosteronproben geringer als in den Kontrollen, die Gabe von Spironolacton allein führt zu keiner Veränderung. Der Wert in der Corticosteronprobe zeigt für diesen Zeitpunkt eine große Standardabweichung und unterscheidet sich aufgrund dessen nicht von anderen Proben, so dass eine Aussage über die Spezifität der Reaktion nicht getroffen werden kann. Auch hier liegt die Expression für alle Proben auf einem sehr geringen Niveau. Die Expression nach 150 Minuten ist ebenfalls durch Aldosteron beeinflusst. Hier ist die Expression in den Aldosteronproben größer als in den Kontrollen, Spironolacton führt zu einer Erhöhung der Expression auf das Niveau der Aldosteronprobe, in der Kombinationsprobe kommt es zu einer Addition der Effekte. Der Wert der Corticosteronprobe ist ebenfalls erhöht und liegt auf einem Niveau mit der Kombinationsprobe. Dabei liegen die Expressionswerte über den Werten der frühen Zeit, mit Werten zwischen 10 und 25 % aber deutlich unter der Expression des Referenzgens. Nach 180 Minuten wiederum ist die Expression in allen Proben deutlich höher. Die Kontrolle zeigt

4. DISKUSSION

180 % der Expression des Referenzgens, die Werte in der Aldosteronprobe sowie der Corticosteronprobe und der Spironolactonkontrolle liegen nahe beieinander mit Werten zwischen 100 und 116 %, hier kommt es also zu einer Beeinflussung durch Spironolacton, wobei es sich erneut um eine Verringerung der Expression handelt. Der Wert in der Kombinationsprobe liegt mit 55 % deutlich darunter und zeigt somit ebenfalls die Kombination der einzelnen Effekte von Spironolacton und Aldosteron.

Auffallend ist, dass die Reaktion in den Aldosteronproben zu verschiedenen Zeiten in verschiedene Richtungen geht, dieser Umstand soll zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert werden.

4.2.2.4 LIS

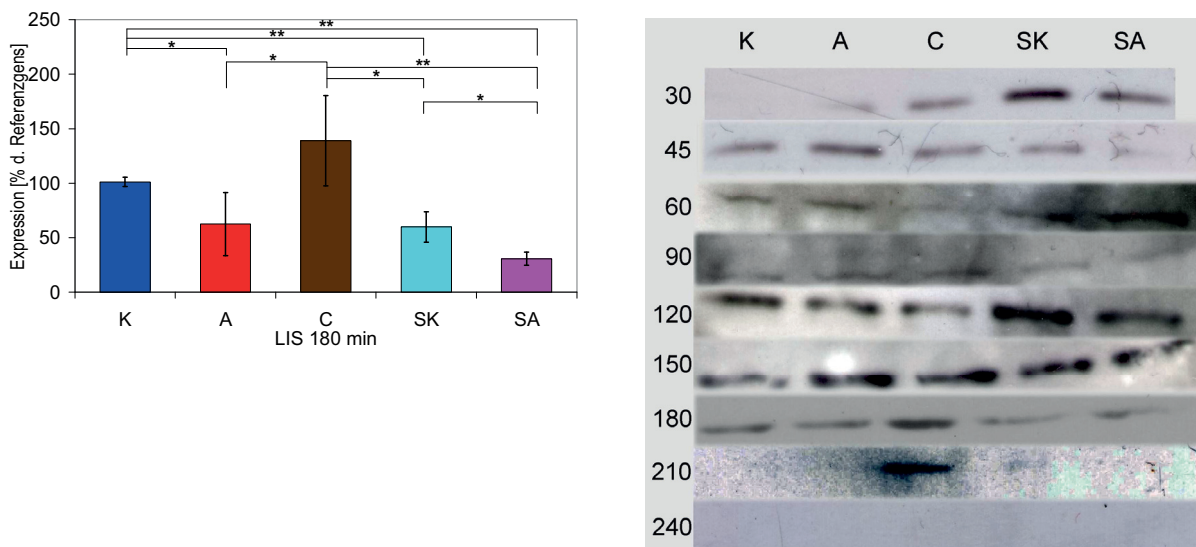


Abb. 4.2.2.4 Gegenüberstellung der Daten für LIS in HL-1 Zellen auf RNA- und Protein-Ebene. HL-1 Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In RT-PCR-Diagramm sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**).

Auch für die Expression von LIS gibt es einen Datensatz mit statistisch signifikanten Unterschieden in der Expression. In den Aldosteronproben ist die Expression erniedrigt, auch die Gabe von Spironolacton allein führt zu einer reduzierten Expression auf das Niveau der Aldosteronprobe. In der Kombinationsprobe ist die Expression noch geringer, auch hier kann also die Kumulation der Effekte beobachtet werden. Die Expression der Corticosteronprobe liegt etwas höher als in der Kontrolle, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant. Der Effekt kann somit als spezifisch für Aldosteron betrachtet werden. In den

4. DISKUSSION

Western Blots zeigen sich schwankende Expressionswerte über die Zeit und zwischen den Proben, insgesamt ist die Expression eher schwach. Zu Beginn ist kein Signal in den Kontrollen detektierbar, nach 240 Minuten in keiner der Proben.

4.2.2.5 FKBP & PPIase

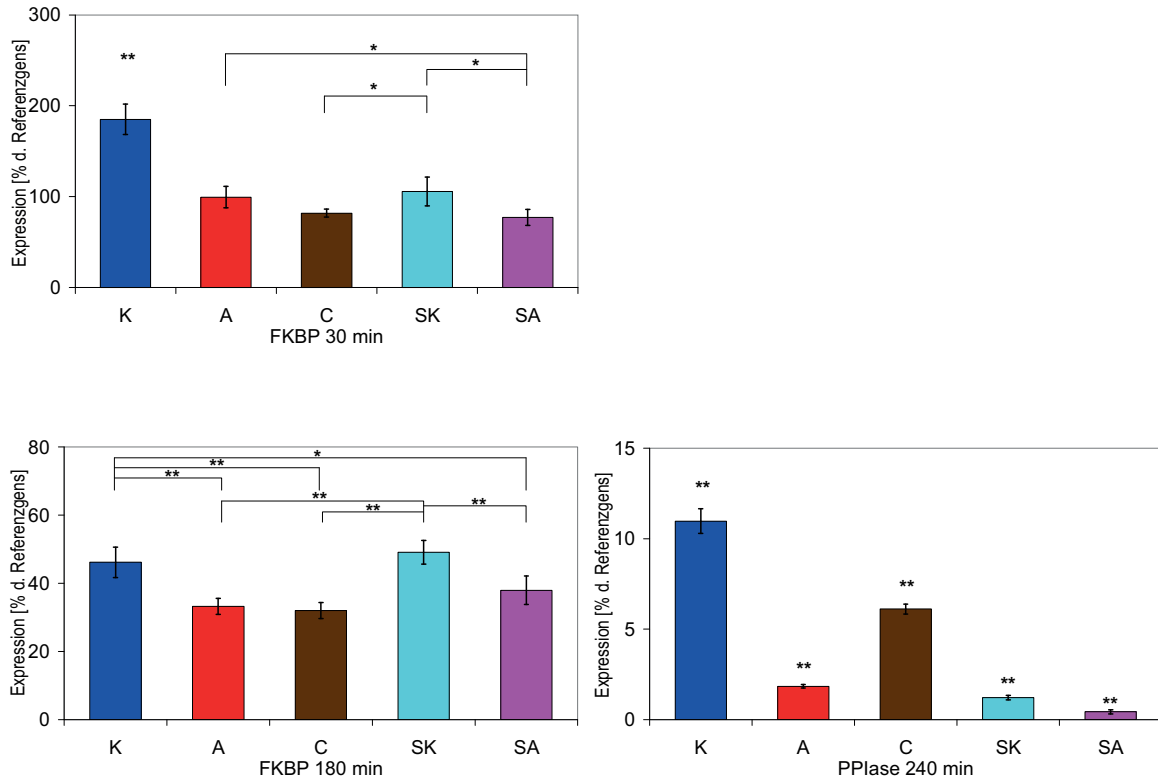


Abb. 4.2.2.5 Vergleich der Daten für FKBP und PPIase in HL-1 Zellen auf RNA-Ebene. HL-1 Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In RT-PCR-Diagramm sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet.

Die Expression von FKBP und PPIase wird in HL-1 Zellen durch Aldosteron reduziert, für FKBP gibt es dazu eine kurzfristige Beeinflussung nach 30 Minuten, hier zeigt Spironolacton allein ebenfalls eine geringere Expression als die Kontrolle, der Corticosteronwert liegt auf einem Niveau mit der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle, in der Kombinationsprobe ist der Wert weiter abgesenkt. In der späteren Phase hingegen (180 min) hat Spironolacton keinen Einfluss mehr, die Werte beider Kontrollen unterscheiden sich nicht. Für PPIase konnten Unterschiede nach 240 Minuten beobachtet werden, auch hier führt Spironolacton zu verminderter Expression, der Wert in der Spironolactonkontrolle liegt mit 1,2% statistisch signifikant unter dem Wert in der Aldosteronprobe (1,8%), während die

4. DISKUSSION

Kombination aus Spironolacton und Aldosteron die Expression noch weiter absenkt (0,4 %). Anders als beim FKBP ist die Expression von PPIase in der Corticosteronprobe weniger stark beeinflusst, der Wert liegt zwar signifikant unterhalb der Kontrolle, jedoch ebenso deutlich über den Werten der Aldosteronprobe und der Spironolactonkontrolle.

4.2.3 Expressionsunterschiede in HCT116 Zellen

4.2.3.1 GAPDH

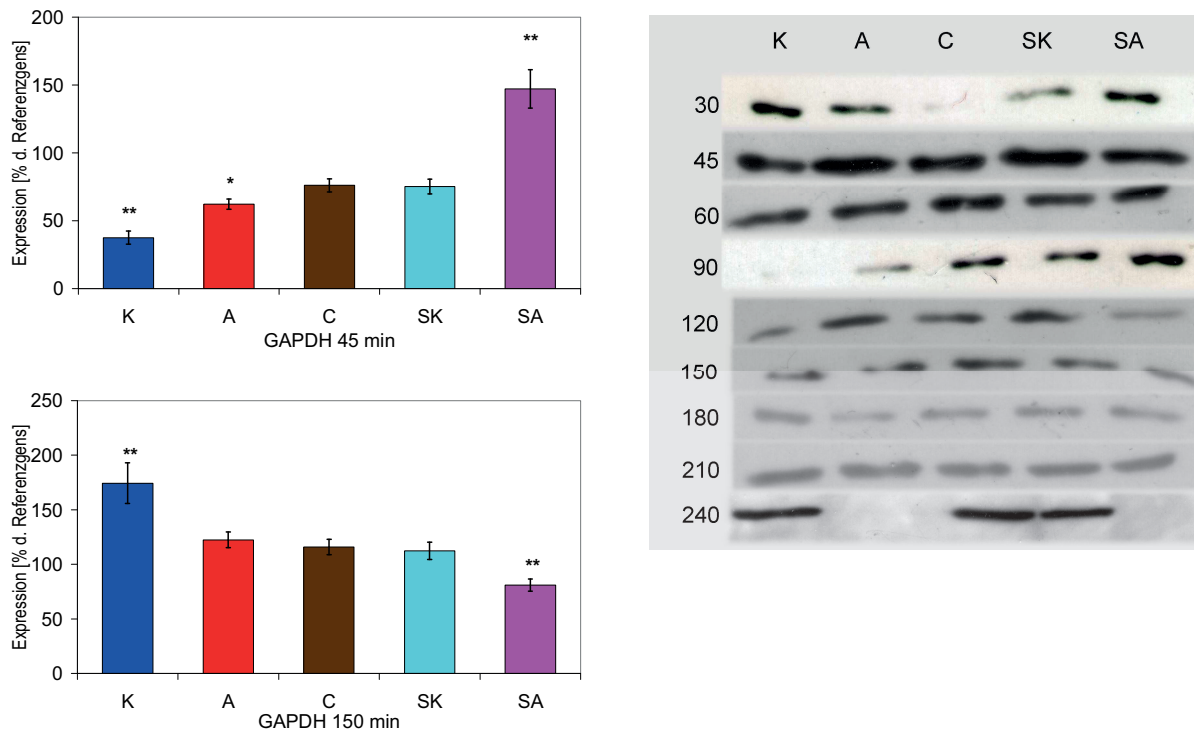


Abb. 4.2.3.1 Gegenüberstellung der Daten für GAPDH in HCT 116 Zellen auf RNA- und Proteinebene. HCT116-Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In den Diagrammen der RT-PCR sind die statistischen Signifikanzen der Proben gekennzeichnet. Unterscheidet sich eine Probe statistisch signifikant von allen anderen, so ist die entsprechende Probe gekennzeichnet. Dabei liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**)

Die Expression von GAPDH in HCT 116 Zellen weicht etwas von der Expression in den übrigen Zelllinien ab, nach 45 Minuten Inkubationszeit kommt es hier zur verstärkten Expression in den Aldosteronproben. Die Werte für Aldosteron, Corticosteron und die Spironolactonkontrolle liegen dabei gleich hoch, auch hier zeigt Spironolacton also einen Effekt, der dem des Aldosterons vergleichbar ist. In der Kombinationsprobe liegt der Wert signifikant höher, auch hier kann also eine Addition der Effekte beobachtet werden. Nach 150 Minuten hingegen stellt sich der Einfluss des Aldosterons mindernd auf die Expression dar, erneut kann dem Spironolacton ebenfalls ein Effekt zugeordnet werden. In Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber Spironolacton zeigt sich die Expression in allen Zelllinien

4. DISKUSSION

einheitlich. Während jedoch in den Fibroblasten und den HL-1 Zellen eine frühe Verminderung und eine späte Erhöhung der Expression auftritt, zeigen die HCT 116 Zellen das entgegengesetzte Phänomen.

In den Western Blots treten erneut stark schwankende Signale über den Zeitverlauf auf. Dabei zeigen die Proteindaten keine Entsprechungen zu den RNA-Daten. Die Stärke der Signale variiert zwischen den Proben, nach 240 Minuten kann in den Aldosteronproben keine Expression nachgewiesen werden.

4.2.3.2 Beta-Aktin

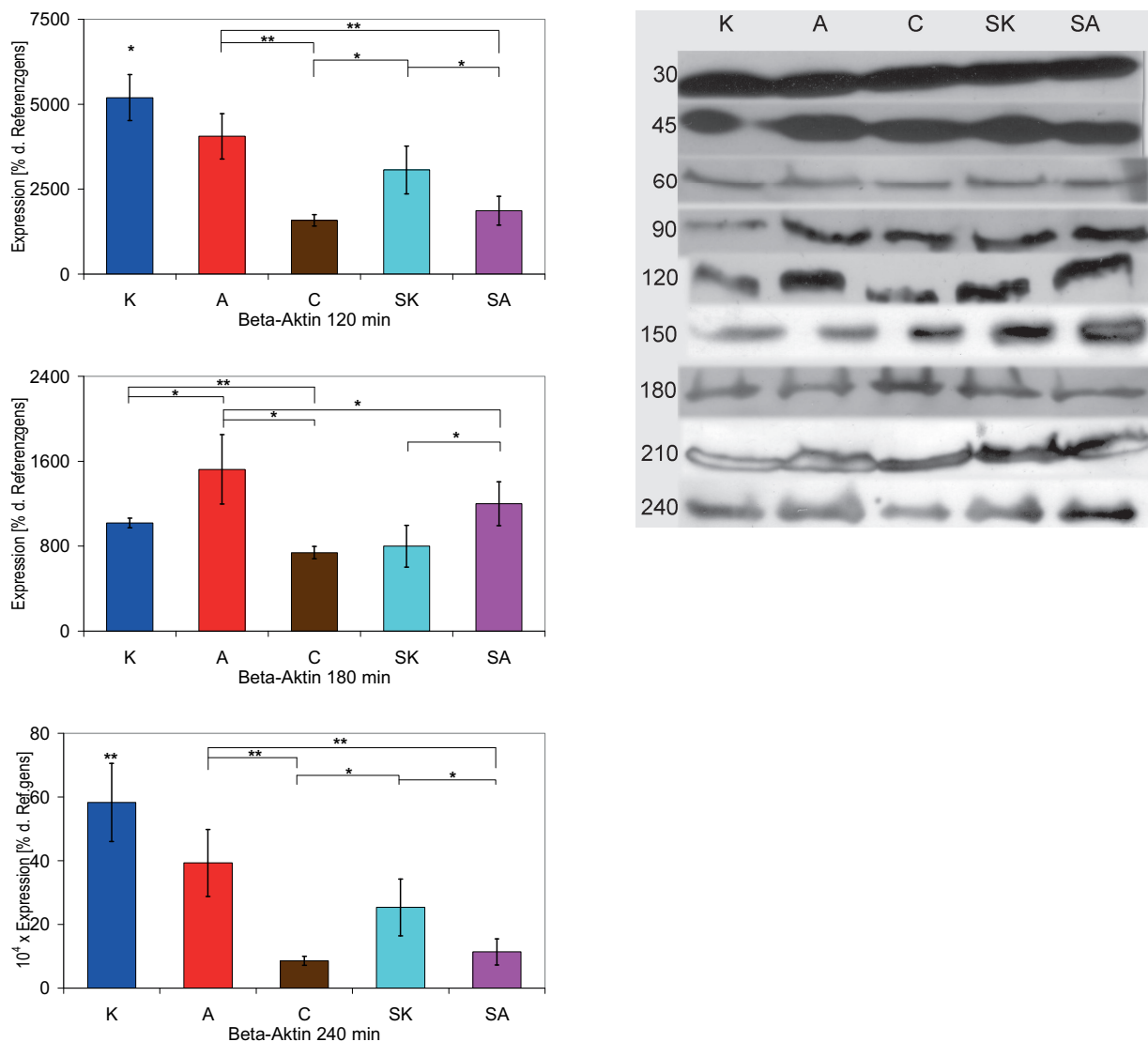


Abb. 4.2.3.2 Gegenüberstellung der Daten für Beta-Aktin in HCT116 Zellen auf RNA- und Protein-Ebene. HCT116-Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In RT-PCR-Diagramm sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet.

4. DISKUSSION

Auch für Beta-Aktin stellen sich die Daten in den HCT 116 Zellen etwas anders dar als in den beiden anderen Zelllinien. Es gibt mehr Datensätze mit Unterschieden als in den anderen Zelllinien, der erste Effekt tritt dabei aber später auf. Nach 120 Minuten kommt es zur verminderten Expression dieses Proteins. Dabei liegen die Werte in der Aldosteronprobe gleich hoch wie in der Spironolactonkontrolle. In der Kombinationsprobe ebenso wie in der Corticosteronprobe ist die Expression niedriger.

Im weiteren Zeitverlauf (180 min) ist die Expression von Beta-Aktin nach Aldosteroninkubation erhöht, Spironolacton und Corticosteron zeigen hingegen gleiche Werte auf etwas geringerem Niveau als in der Kontrolle. Nach 240 Minuten tritt erneut eine verminderte Expression auf. Wie nach 120 Minuten ist die Spironolactonkontrolle ebenfalls davon betroffen und die Expression in der Corticosteronprobe liegt noch unterhalb der der Kombinationsprobe.

In den Western Blots zeigen sich sehr starke Signale in allen Proben nach 30 und 45 Minuten, danach nimmt die Expression deutlich ab, Unterschiede, die unabhängig von der Spironolactonbehandlung zwischen den Aldosteronproben und den Kontrollen vorliegen, treten dabei nicht auf.

4.2.3.3 LIS

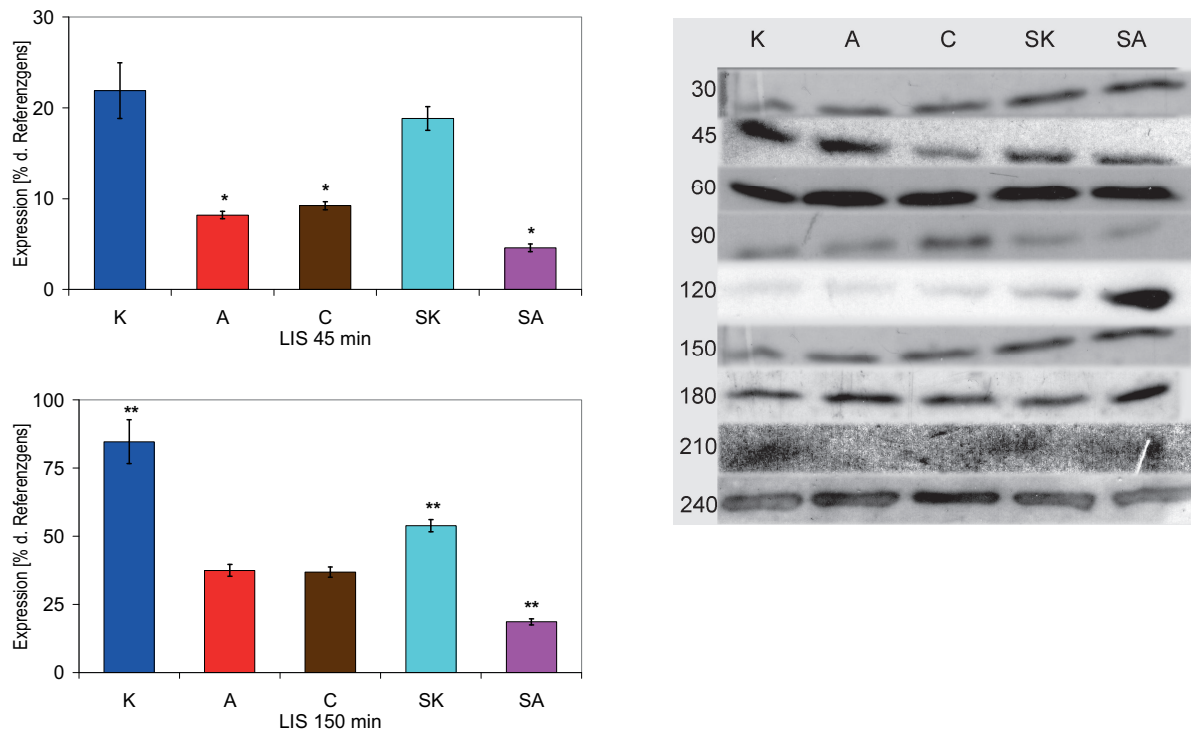


Abb. 4.2.3.3 Gegenüberstellung der Daten für LIS in HCT116 Zellen auf RNA- und Protein-Ebene. HCT116-Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 μ M Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In den Diagrammen der RT-PCR sind die statistischen Signifikanzen der Proben gekennzeichnet. Unterscheidet sich eine Probe statistisch signifikant von allen anderen, so ist die entsprechende Probe gekennzeichnet. Dabei liegt die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**)

Die Expression von LIS ist nach der Aldosteronbehandlung reduziert, hier kommt es zu einer frühen Reaktion nach 45 Minuten, von der die Spironolactonprobe nicht betroffen ist, der Wert liegt zwar tendenziell unter dem der Kontrolle, es liegt jedoch keine Signifikanz vor. Die Expression in der Corticosteronprobe entspricht der der Aldosteronprobe, in der Kombinationsprobe ist die Expression noch niedriger.

Nach 150 Minuten kommt es ebenfalls zu verminderter Expression in den Aldosteronproben, diesmal liegt auch die Expression in der Spironolactonkontrolle signifikant unter der Kontrolle.

Die Signale in den Western Blots sind insgesamt deutlich stärker als in den Fibroblasten und den HL-1 Zellen, dabei sind die Signale nach 60 Minuten in allen Proben besonders stark, die Signale unterscheiden sich dabei nur geringfügig voneinander. Nach 120 Minuten ist das deutlich stärkste Signal in der Kombinationsprobe zu sehen, die anderen Proben liegen hier gleichermaßen schwächer vor.

4.2.3.4 FKBP & PPlase

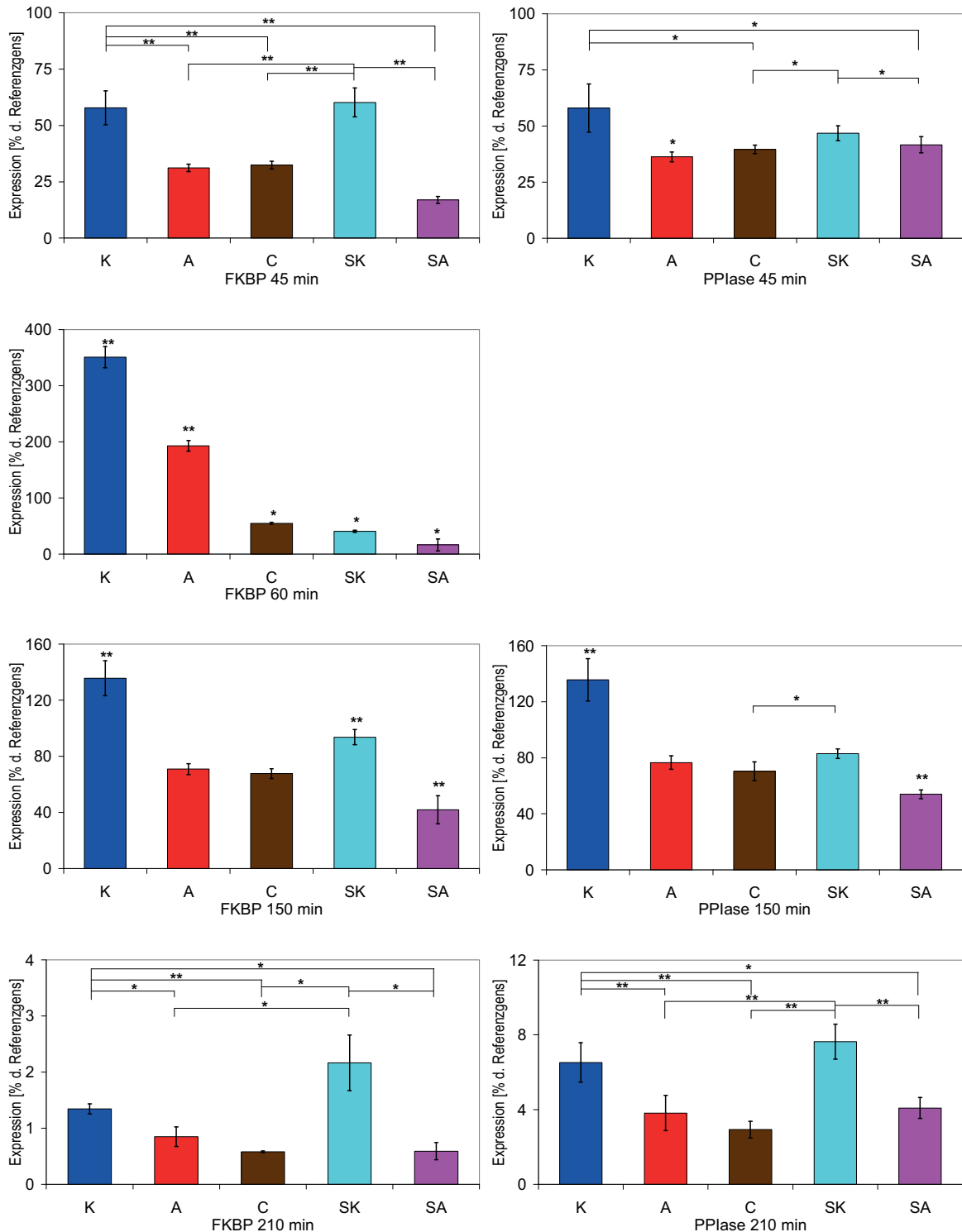


Abb. 4.2.3.5 Vergleich der Daten für FKBP und PPlase in HCT 116 Zellen auf RNA-Ebene. HCT116-Zellen wurden mit 10 nM Aldosterone (A), Corticosteron (C), bzw. dem gleichen Volumen Ethanol (K) inkubiert. Für Spironolactonproben erfolgte eine 30-minütige Präinkubation mit 10 µM Spironolacton, bevor ihnen 10 nM Aldosteron (SA) oder das gleiche Volumen Ethanol (SK) zugesetzt wurde. In RT-PCR-Diagramm sind die statistischen Beziehungen der Proben durch Klammern gekennzeichnet, dabei ist die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ (*), bzw. $p < 0,001$ (**). Unterscheidet sich eine Probe signifikant von allen anderen, so ist sie der besseren Übersichtlichkeit wegen gekennzeichnet.

4. DISKUSSION

Für die Expression von FKBP und PPIase gibt es in den HCT 116 Zellen die meisten Datensätze mit Unterschieden zwischen den Aldosteronproben und den Kontrollen. Dabei zeigen sich große Übereinstimmungen zwischen den Kandidaten, häufig sind die gleichen Zeiten betroffen, in vielen Fällen liegt die Expression zumindest der Kontrolle nahezu identisch vor und auch bei den anderen Proben gibt es nur geringe Unterschiede. Häufig entspricht der Wert in den Corticosteronproben dem des Aldosterons. Die HCT 116 Zellen zeigen hier vermutlich eine generelle Empfindlichkeit gegenüber Steroiden. Zu einem Zeitpunkt (60 min) unterscheiden sich jedoch die Werte für die Aldosteronprobe und die Corticosteronprobe deutlich voneinander, dieser spezifische Aldosteroneffekt tritt lediglich in der Expression von FKBP auf, im Fall der PPIase ist die Expression in der Aldosteronprobe deutlich gesteigert gegenüber der Kontrolle, während die Vorbehandlung mit Spironolacton den Effekt umkehrt.

In allen verwendeten Zelllinien liegt für die gewählten statistischen Kriterien eine verringerte Expression von FKBP und PPIase durch Aldosteroneinfluss vor. In den vorhergehenden Untersuchungen in der Spalthefe war die PPIase hingegen das einzige Protein, dessen Spotintensität im 2-D Gel infolge der Aldosteronbehandlung zunahm.

In den Zellkulturen wird die Expression durch Aldosteron beeinflusst, möglicherweise geschieht dies aber über andere Mechanismen als in der Spalthefe.

4.3. Einflüsse auf die Versuchsergebnisse

Bevor die untersuchten Kandidaten im Detail diskutiert werden, sollen zunächst verschiedene allgemeine Aspekte besprochen werden. Auffallend an den Gesamtdaten war vor allem, dass die Expressionswerte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene starke Schwankungen über den Expressionszeitraum zeigten. Auf verschiedene mögliche Ursachen und Interpretationsmöglichkeiten soll im Folgenden eingegangen werden.

4.3.1 Der Einfluss von Spironolacton

Von Spironolacton ist bekannt, dass es eine Vielzahl nicht-genomischer Effekte hervorruft. Da der Komplex aus Spironolacton und dem MR größtenteils im Cytosol verbleibt (Lombes *et al.*, 1994; Sonder *et al.*, 2006b), muss die Ursache für eine veränderte Expression außerhalb des Zellkerns liegen.

In der Klinik wird Spironolacton neben der Indikation der Herzerkrankungen ebenfalls bei Patienten mit rheumatoider und juveniler idiopathischer Arthritis eingesetzt. Bei diesen Patienten können die Entzündungsreaktionen durch die Gabe von Spironolacton gelindert werden. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden in der Arbeitsgruppe von Klaus Bendtzen Untersuchungen an humanen mononukleären Blutzellen durchgeführt (Sonder *et al.*, 2006a). Hierzu wurden die Zellen mit Spironolacton, Aldosteron, sowie den Spironolacton-Metaboliten 7 α -Thiomethyl-Spironolacton (7TS) und Canrenon (CAN) und mit einer Kombination von Spironolacton und Aldosteron behandelt (jeweils 100 μ M). Fünfzehn Minuten nach der Inkubation wurde eine Immunantwort der Zellen durch die Zugabe von Lipopolysacchariden und Phytohämagglutinin A eingeleitet. Nach vier Stunden wurde die RNA isoliert und die Transkription mit Hilfe von Affymetrix Genechips untersucht.

Die vergleichende Analyse wurde mit zwei verschiedenen Auswertesystemen getrennt für die Zellen der einzelnen Individuen durchgeführt, dabei wurden nur Kandidaten aufgenommen, die auch in den unbehandelten Proben vorhanden waren, mit beiden Auswertungen gefunden und einheitlich in allen drei Spendern beeinflusst wurden. Selbst diese stringenten Auswahlkriterien lieferten eine Anzahl von 1018 Genen, deren Expressionsprofil von Spironolacton beeinflusst wurde. Für die Kombination von Spironolacton und Aldosteron wurden 940 Gene als reguliert gefunden, während für Aldosteron allein noch 17 Hits erzielt wurden. Canrenon zeigte keinerlei Einfluß, 7TS beeinflusste wie Aldosteron 17 Gene. Details zu den Daten werden nicht genannt, so dass ein Vergleich der betroffenen Gene nicht möglich ist. Mehrere Aspekte der Untersuchung sind bemerkenswert. Die Empfindlichkeit der Zellen auf sowohl Spironolacton als auch Aldosteron schwankt beträchtlich zwischen den einzelnen Individuen. Für Spironolacton

4. DISKUSSION

liegen die Werte zwischen ca. 1600 und 2100, für Aldosteron schwanken die Werte im Verhältnis dazu sogar stärker zwischen 38 und 73. Dabei zeigt der Spender, dessen Blutzellen am empfindlichsten auf Spironolacton reagieren, die geringste Empfindlichkeit auf Aldosteron und umgekehrt.

Da die Untersuchung sich auf die Immunantwort konzentrierte, werden im Weiteren lediglich Daten zu Genen präsentiert, die mit der Immunantwort assoziiert sind. Von den 1018 regulierten Genen wurden 187 hochreguliert, während für eine verminderte Expression 831 Transkripte genannt werden (Sonder *et al.*, 2006a; Sonder *et al.*, 2006b). Dieser Umstand, der auf die begrenzte Kapazität der Zellen zur Transkription zurückzuführen sein könnte, scheint für die verminderten Immunreaktionen verantwortlich zu sein, ein Großteil der Transkripte, die von NF- κ B vermittelt werden, ist herunterreguliert, lediglich der vaskuläre endothelialer Wachstumsfaktor VEGF ist hochreguliert.

Ein größerer Einfluss von Spironolacton im Vergleich zu Aldosteron konnte für die hier untersuchten Kandidaten nicht bestätigt werden. Dies kann auf die geringe Menge an untersuchten Kandidaten zurückzuführen sein, könnte jedoch ebenfalls auf eine Spezifität der Reaktionen für Aldosteron hinweisen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sonder *et al.* konnte in der vorliegenden Untersuchung häufig beobachtet werden, dass mit Spironolacton behandelten Proben hinsichtlich der Expression die gleichen Reaktionen zeigten wie mit Aldosteron behandelte Proben. Dies deutet einerseits auf eine Beteiligung des Mineralocorticoidrezeptors hin, jedoch muss zumindest in den mit Spironolacton behandelten Proben die Vermittlung der Reaktion außerhalb des Zellkerns vermittelt werden. Da die Reaktion durch Aldosteron zum gleichen Zeitpunkt auftritt, kann die gleiche Wirkungsweise (potentiell im Zusammenhang mit dem Rezeptor, jedoch außerhalb des Zellkerns) vermutet werden.

Auffällig ist hierbei ebenfalls, dass in diesen Fällen die Reaktion durch die Kombination aus Spironolacton und Aldosteron zu einer verstärkten Reaktion führte, im Fall der GAPDH in Fibroblasten (150 min) sogar zu einer Expression, die deutlich über der Summe derer aus mit Spironolacton und Aldosteron behandelten Proben lag.

Die meisten Effekte des Aldosterons auf die Transkription traten zu frühen Inkubationszeiten auf, während für die Untersuchung der Immunreaktion die Proben nach vier Stunden genommen wurden. Auch die wesentlich höhere eingesetzte Konzentration von 100 μ M könnte für die massive Beeinflussung der Transkription verantwortlich sein.

4.3.2. Allgemeine Anmerkungen

4.3.2.1 Proteinkonzentrationen in Zellen

Ein Prinzip, das ganz grundsätzlich zu beachten ist, liegt in den generellen Konzentrationsbedingungen der Zelle. Die Menge an Makromolekülen, die in der Zelle unter normalen Arbeitsbedingungen vorliegt, ist beeindruckend, der Proteingehalt kann im Cytosol bis zu 400 mg/ml betragen (Svedruzic und Spivey, 2006). Gibt es innerhalb der Zelle einen erhöhten Bedarf an bestimmten Proteinen, so müssen als Ausgleich andere Proteine in der Expression vermindert werden. Hier ist es vorstellbar, dass eine solche Ausgleichsreaktion zunächst über hoch repräsentierte Proteine, wie sie GAPDH und ebenfalls Aktin darstellen, erfolgt. Unterschiede in den Expressionsleveln können also auf eine Regulation „zweiter Ordnung“ hinweisen.

4.3.2.2 Biologische Varianz in Zellkulturexperimenten

Alle RT-PCR Experimente wurden mit technischen Triplikaten durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Die biologische Varianz in Zellkulturexperimenten ist hoch, so dass Proben aus unterschiedlichen Präparationen zwar die gleichen Trends zeigen, die Intensität der Reaktion sich jedoch unterscheidet. Weitere Ursachen dafür werden in der Reihenfolge des Versuchsablaufs genannt:

- Die Proben werden getrennt kultiviert, es werden gleich viele Zellen pro Schale ausgesät, jedoch können sie sich in verschiedenen Schalen unterschiedlich entwickeln. Eine Bestimmung der Zellzahl vor dem Experiment wurde nicht durchgeführt, da das Ablösen der Zellen mithilfe von Trypsin über die Interaktion mit Membranproteinen den physiologischen Status der Zellen beeinflusst (Teng *et al.*, 2009).
- Unterschiedliche Effizienz bei der Präparation führt zu Schwankungen hinsichtlich der Qualität der Proben. Meiner Einschätzung nach ist es bei den Proteinproben eher möglich, sie in gleich bleibender Qualität zu präparieren, da zum einen die Proteine erheblich stabiler sind als die RNA. Darüber hinaus beinhaltet die Proteinpräparation weniger Versuchsschritte.
- Neben der generell größeren Fragilität der RNA-Proben werden sie sowohl bei der Herstellung der cDNA als auch bei der RT-PCR durch eine enzymatische Reaktion vervielfältigt, bei der nicht nachvollziehbar ist, inwieweit alle Proben mit gleicher Effizienz reagieren.
- Bei den primären Fibroblasten kommt als weiterer Faktor für Schwankungen hinzu, dass es sich um Präparationen aus verschiedenen Würfen handelt. Dabei werden die Herzzellen der einzelnen Tiere gepoolt, Unterschiede zwischen den Individuen werden

dadurch abgeschwächt, trotzdem handelt es sich von Präparation zu Präparation um unterschiedliches genetisches Ausgangsmaterial.

4.3.2.3 Zellkulturbedingungen

In dieser Untersuchung wurde, wo immer möglich, unter möglichst physiologischen/natürlichen Bedingungen gearbeitet. Dies bezieht sich nicht nur auf die verwendeten Konzentrationen der Stoffe, mit denen die Zellen behandelt wurden, sondern auch auf die Medienbedingungen, unter denen inkubiert wurde.

Vielfach wird für Zellkulturversuche eine Synchronisation der Zellen im Zellzyklus durchgeführt. Serumdeprivation führt zu einem Zellzyklusarrest in der G₀-Phase (Iyer *et al.*, 1999), während Chemikalien wie Aphidicolin oder Butyrylacton die Zellen im Übergang von der G₁ zur S-Phase oder im Übergang von der G₂ zur M-Phase festsetzen (Pedrali-Noy *et al.*, 1980). Unter diesen Bedingungen ist generell damit zu rechnen, dass die Reaktionen der Zellen deutlicher zu beobachten sind, da das Material homogener wird und sich die Zellen bereits im Stress befinden. Auf diese Vorgehensweise wurde bei den vorliegenden Untersuchungen bewusst verzichtet, um eine möglichst unverfälschte Reaktion auf die Steroide zu erhalten.

4.3.2.4 Technische Anmerkungen zur RT-PCR

Die Bestimmung der Kopienanzahl, über die die Normalisierung und die relative Expression der Kandidaten im Vergleich zum Referenzgen erfolgt, wird an einer Eichgeraden durchgeführt. Hierzu ist anzumerken, dass die Konzentration des Standards, der aus einer Plasmidpräparation verdünnt wird, stabil bleibt, während die cDNA Konzentration in Abhängigkeit der verschiedenen RNA-Präparationen variiert. Diese Ungleichheit spiegelt sich in den Auswertungsdaten wider.

Darüber hinaus ist auffällig, dass die Konsistenz der Daten innerhalb der einzelnen Experimente besser ist, wenn es aufgrund der cDNA-Mengen möglich war, gleiche Ausgangsmengen in den Proben einzusetzen. In diesen Fällen lagen die Ct-Werte für die Referenzgene in allen Proben in einem so engen Bereich, dass die Normalisierung der Daten nur zu minimalen Änderungen führte. Erforderten die ungleichen Ausbeuten der RNA-Präparation hingegen die Vorlage unterschiedlicher Mengen cDNA, so ergaben sich für die Experimente ähnliche Muster in der Verteilung der Daten. Dabei lagen jedoch zwischen den Kandidaten Unterschiede hinsichtlich der signifikanten Beziehung zwischen den Proben vor, so dass eine „Verfälschung“ der Daten unwahrscheinlich ist. Inwieweit dieses Phänomen eher einen „Schatten“ der Normalisierung darstellt oder auf die Ungenauigkeit der Eichgeraden im Verhältnis zu den Proben zurückzuführen ist, ist unklar.

4.3.3 Der virtuelle zeitliche Verlauf der Expression in Fibroblasten

Ein direkter Vergleich zwischen den Daten aus verschiedenen Experimenten ist nicht möglich. Auf technischer Seite verhindert die unterschiedliche Effizienz der PCR-Läufe einen direkten Vergleich. Stärker wiegt sicherlich die biologische Varianz. Die Proben für unterschiedliche Inkubationszeiten stammen jeweils aus anderen Präparationen und sind somit genetisch verschieden. Dies gilt vor allem für die Fibroblasten, hier wurden jeweils die Zellen der Tiere aus 1-2 Würfen gepoolt, aber auch Zellen aus Zelllinien unterliegen in der Zellkulturschale einer Mikroevolution.

Um einen besseren Überblick zu gewinnen, soll jedoch ein „virtueller Zeitverlauf“ erstellt und an einigen Beispielen besprochen werden.

4.3.3.1 GAPDH

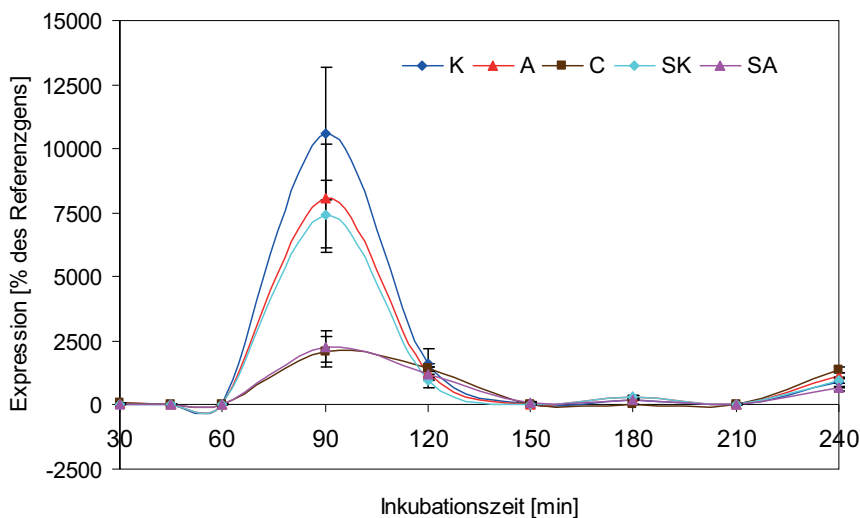


Abb.4.3.3.1 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von GAPDH in Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

Der Vergleich der Expression im Zeitverlauf zeigt in allen Proben das gleiche Muster, die Stärke der Schwankungen unterscheidet sich in den einzelnen Proben. Auffallend ist, dass die Expression in der Kontrolle ebenfalls stark schwankt. Möglicherweise ist die Expression natürlicherweise starken Schwankungen unterworfen.

Betrachtet man die Kontrolle als Basis und bereinigt die Graphen entsprechend durch Subtraktion der Kontrollwerte, so ergibt sich folgendes Bild.

4. DISKUSSION

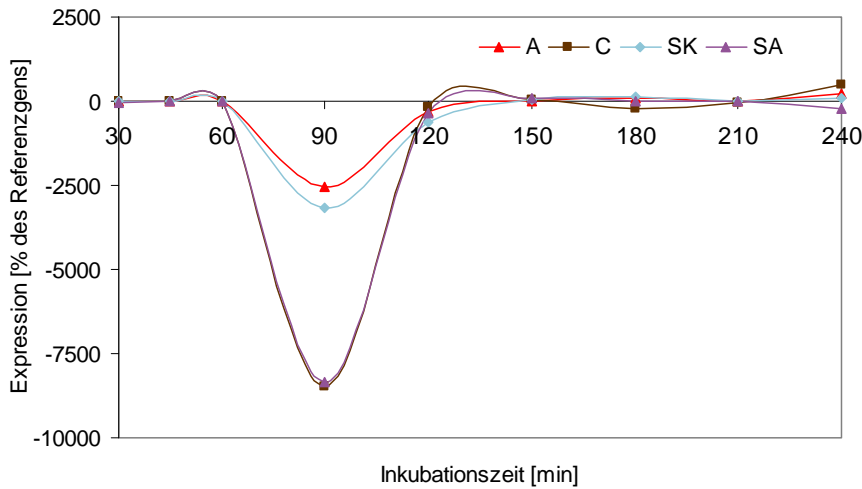


Abb.4.3.3.2 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von GAPDH in Fibroblasten als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

Laufen die Proben zu den ersten Inkubationszeiten noch relativ nahe an der Kontrolle, so kommt es im weiteren Zeitverlauf zu größeren Schwankungen. Dabei verlaufen die Kurven für Aldosteron und die Kombinationsprobe aus Spironolacton und Aldosteron bis 120 Minuten weitgehend gleich. Auffallend ist die Kurve für die Spironolactonkontrolle, sie zeigt größere teilweise höhere Abweichungen zur Kontrolle als die Aldosteronproben. An der Differenzdarstellung lässt sich gut erkennen, warum zu unterschiedlichen Zeiten die Werte teils höher und teils niedriger liegen als in der Kontrolle: ist auch die Frequenz, mit der die Kurven schwanken, weitgehend gleich, so unterscheiden sich die Amplituden der Kurven voneinander.

4.3.3.2 Beta-Aktin

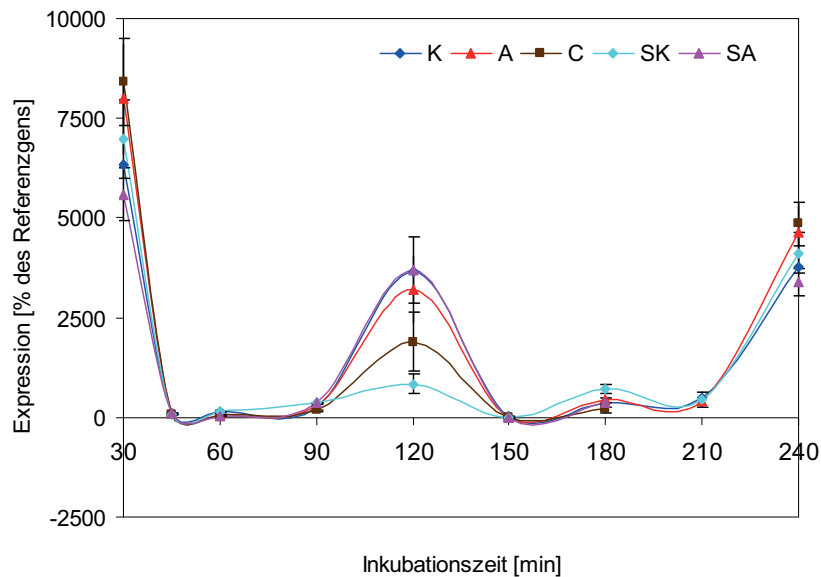


Abb.4.3.3.2.1 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von Beta-Aktin in Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

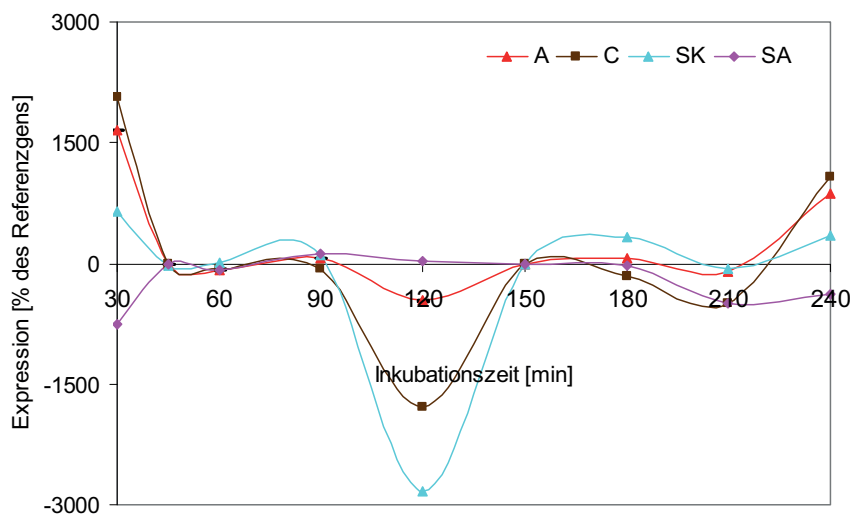


Abb.4.3.3.2.2 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von Beta-Aktin in Fibroblasten als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

Das Expressionsmuster von Beta-Aktin über die Zeit ähnelt hinsichtlich des Kurvenverlaufs dem des GAPDH, jedoch tritt eine Verminderung der Expression verzögert auf. Zwischen 60

4. DISKUSSION

und 210 Minuten schwankt die Expression in der Kontrolle jedoch kaum, so dass die Unterschiede in der Differenzdarstellung größer sind als beim GAPDH.

Für Beta-Aktin gibt es nach 60 Minuten kaum noch Unterschiede von der Kombinationsprobe zur Kontrolle; bis 180 Minuten verläuft die Kurve sehr nah an der Kontrolle. Im Gegensatz dazu gibt es jedoch große Schwankungen sowohl in der Corticosteronprobe als auch in der Spironolactonkontrolle. Geht man davon aus, dass der Effekt des Aldosterons durch das Spironolacton gedämpft wird, so bleibt in diesem Fall die Frage offen, welcher Art der Effekt ist, der in der Spironolactonkontrolle auftritt.

Die Kurvenverläufe für die Expression von IPP und LIS sind ähnlich (vgl. Abb. 6.1 und 6.2), lediglich die Corticosteronprobe ist im Falle des IPP vollständig von den anderen Proben unterschiedlich. Die Expressionsprofile von FKBP und PPlase weisen jedoch einige interessante Aspekte auf und sollen genauer betrachtet werden.

4.3.3.3 FKBP

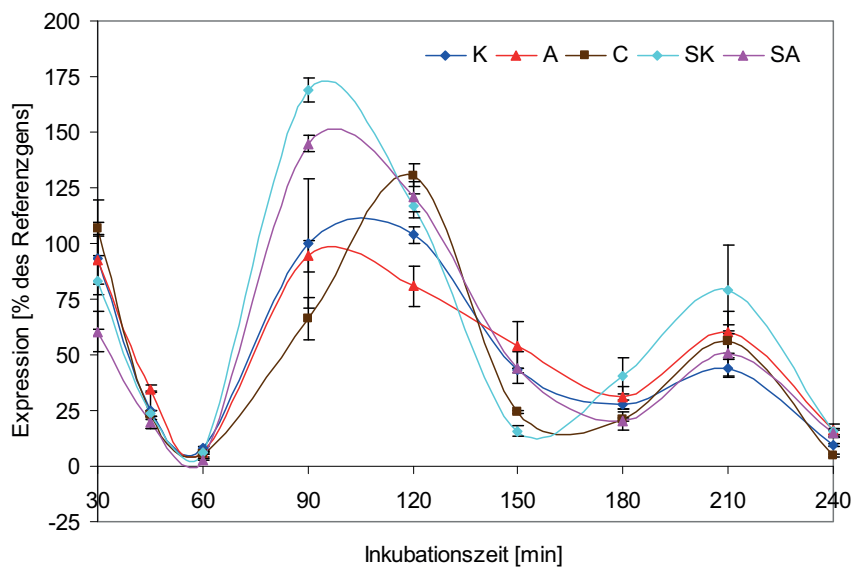


Abb.4.3.3.3.1 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von FKBP in Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

4. DISKUSSION

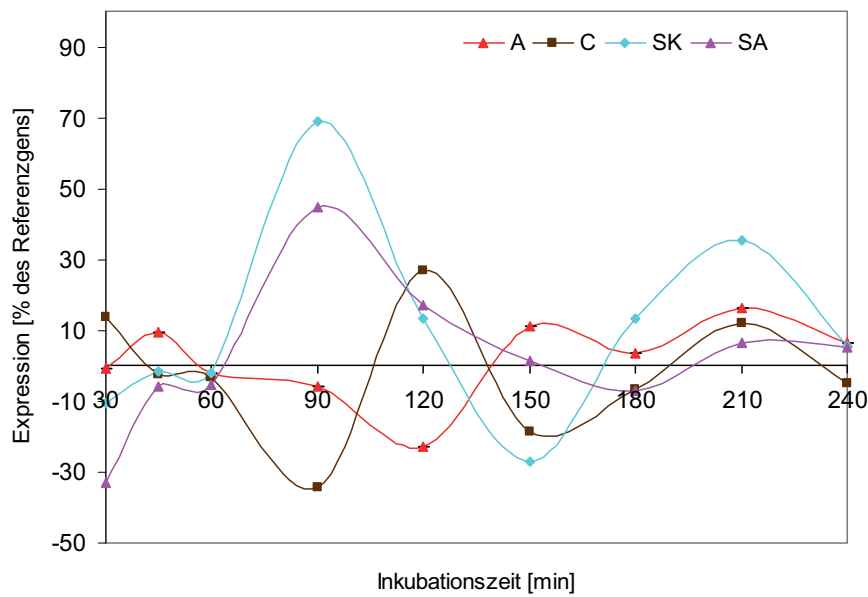


Abb.4.3.3.3.2 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von FKBP in Fibroblasten als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

Bei der Expression von FKBP verschieben sich die Frequenzen der Kurven zwischen den einzelnen Proben. Die beiden Spironolactonproben laufen fast über den gesamten Zeitraum sehr nahe zueinander. Durch die Frequenzunterschiede lässt sich dies in der Differenzdarstellung jedoch nicht mehr nachvollziehen.

4.3.3.4 PPlase

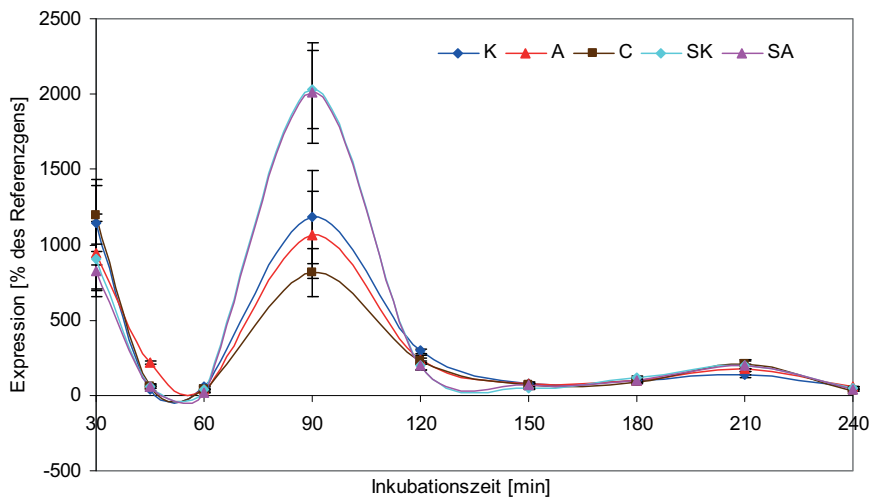


Abb.4.3.3.7 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von PPlase in Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

Wie bei der Expression von FKBP kommt es im Falle der PPlase zu nahezu identischen Kurven zwischen den beiden Spironolactonproben. Im Gegensatz zum FKBP ist jedoch die Frequenz zwischen den Proben weniger unterschiedlich, so dass sich auch in der Differenzdarstellung gleichlaufende Kurven ergeben.

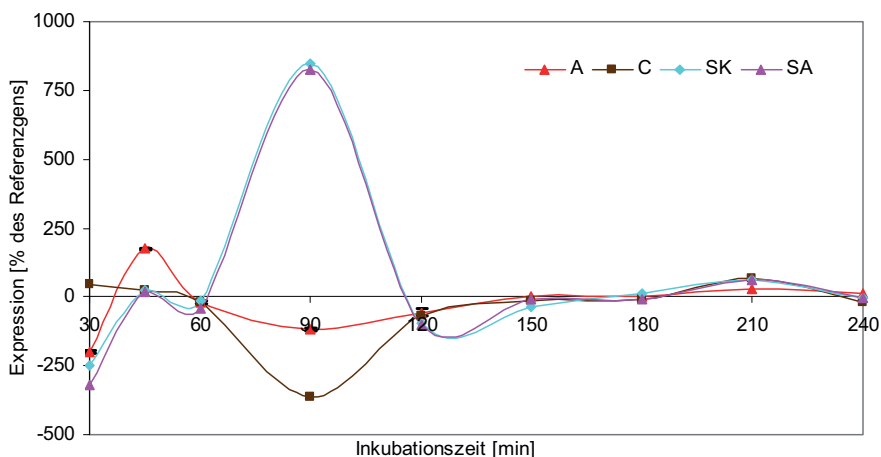


Abb.4.3.3.8 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von PPlase in Fibroblasten als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

4. DISKUSSION

Die Abbildungen der virtuellen Zeitverläufe und der Differenzdarstellungen zur Kontrolle für die übrigen Kandidaten und Zellkultursysteme findet sich im Anhang (Abb. 6.1-Abb.6.28).

Insbesondere vor dem Hintergrund, dass man lange Zeit von Beta-Aktin und GAPDH postuliert hat, sie seien permanent stabil exprimiert, stellt sich die Dynamik der Expression zunächst überraschend dar.

Bedenkt man jedoch, dass zur Transkription DNA entwunden werden muss, um sie ablesen zu können, so erscheint die Möglichkeit, dass die Expression dynamisch um einen Sollwert oszilliert, eine geschickte Möglichkeit, mit den Ressourcen der Zelle zu haushalten. Die Beobachtung, dass zum gleichen Zeitpunkt hohe Proteinmengen, aber geringe RNA-Mengen vorliegen, wie es bei der Expression von LIS in Fibroblasten nach 60 Minuten Inkubationszeit der Fall war, würde sich in diesen Zusammenhang gut einfügen.

Ein weiterer Ansatz zu Dynamik der Expression könnte die zirkadiane Abhängigkeit sein. HMG-CoA-Reduktase, Squalen Epoxidase und CYP7A1 sind an der Biosynthese des Cholesterins beteiligt, alle drei werden zirkadian exprimiert und zeigen die größte Expression ungefähr in der Mitte der Wachphase (Sukumaran *et al.*, 2010). Auch der Blutdruck schwankt im 24h Rhythmus und Steroidhormone werden in Abhängigkeit von der Tageszeit freigesetzt. Von Gewebekulturen aus Pflanzen (*A. thaliana*, *Brassica rapa*) weiß man, dass die Zellen in der Lage sind, einem stabilen zirkadianen Rhythmus zu folgen (Xu *et al.*, 2010). Mittlerweile sind auch die ersten Zelllinien bekannt, die in der Lage sind, einen zirkadianen Rhythmus aufrecht zu erhalten (Chalmers *et al.*, 2008). Inwiefern unter physiologischen Bedingungen ein zirkadianer Rhythmus in Zellkulturen auftritt, ist nicht bekannt. Wenn die Freisetzung von Hormonen tageszeitlich unterschiedlich ist, so erscheint es im Umkehrschluss auch wahrscheinlich, dass die Sensitivität auf Signale im Tagesverlauf schwankt.

4.4 Wie können die Kandidaten durch Aldosteron beeinflusst werden?

Nachdem bisher eher allgemeine Bemerkungen zu den Daten diskutiert wurden, sollen nun die Kandidaten und die potentiellen Zusammenhänge zur Aldosteronwirkung diskutiert werden (vgl. Abb. 4.4.1).

4.4.1 GAPDH & Aldosteron – eine mögliche biologische Verknüpfung

Die Funktionen, die GAPDH in der Zelle erfüllt, sind vielfältig. Neben der Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat in der Glykolyse und der Gluconeogenese kann GAPDH z. B. Strukturproteine der Muskeln binden oder mit Nukleinsäuren interagieren.

Svreduzic *et al.* konnten eine spezifische Interaktion von GAPDH aus Mammaliern mit L-Lactat-Dehydrogenase aus Herz und Muskel unter hohen Proteinkonzentrationen zeigen. Der Proteingehalt der Zelle kann im Cytosol bei einer Proteinkonzentration zwischen 200 und 400 mg/ml liegen, in der mitochondrialen Matrix kann die Proteinkonzentration sogar bis zu 560 mg/ml betragen. Unter diesen Bedingungen können Interaktionen zwischen Proteinen beobachtet werden, die im aufgereinigten Zustand nicht miteinander wechselwirken können.

Die Simulation dieser Bedingungen in Polyethylenglykol-Lösung führte zu der Entdeckung, dass GAPDH aus Mammalierzellen in der Lage ist, Interaktionen mit Lactat-Dehydrogenase aus Herz und Muskelzellen einzugehen. Diese Interaktionen sind spezifisch, sie konnten für zwei verschiedene Isozyme der L-Lactat-Dehydrogenase gezeigt werden, die sich hinsichtlich der Nettoladung und ihrer Löslichkeit in PEG unterscheiden. Darüber hinaus fand keine Interaktion statt, wenn einer der beiden Bindungspartner durch Moleküle ersetzt wurde, die in Größe und Ladung ähnlich sind. Selbst Bindung zur GAPDH aus anderen Spezies (obwohl hochkonserviert und mit über 55% Sequenzidentität) erfolgte nicht. Als biologische Schlussfolgerung ermöglicht die Interaktion zwischen GAPDH und L-Lactat-Dehydrogenase eine Einflussnahme auf den NAD^+ /NADH-Metabolismus (Svedruzic und Spivey, 2006)

GAPDH und LDH sind Teil der Glykolyse, die die Zellen mit metabolischen Vorläufern versorgt und eine schnelle Energiequelle darstellt. Der cytosolische NAD^+ /NADH-Pool kann die Zellatmung, den mitochondrialen NAD^+ /NADH-Pool sowie zelluläre anabole Prozesse, die wiederum vom NAD^+ /NADH-Pool abhängen beeinflussen. Diese drei Speicher sind hochgradig unbalanciert mit einem Verhältnis von NAD^+ zu NADH von 700 im Cytosol, 0,1 in den Mitochondrien sowie einem Verhältnis zwischen NADP^+ /NADPH von 0,1 im Cytosol.

Das NAD^+ /NADH Verhältnis ist auch im Zusammenhang mit dem Mineralokortikoidrezeptor von Bedeutung. In Epithelien und Blutgefäßen wird der MR mit 11- β Hydroxysteroid-Dehydrogenase koexprimiert. Dieses Enzym wandelt Cortisol, das die gleiche Bindungsaffinität zum MR aufweist wie Aldosteron, aber im Überschuss vorliegt, in die inaktive Form Cortison um. Aldosteron besitzt am C-18 eine reaktive Aldehydgruppe, die mit der β -Hydroxylgruppe cyclisiert und ein 18, 20 Hemiactal bildet. Das Plasmaaldosteron

4. DISKUSSION

besteht zu über 99% aus dieser Ringform, die kein Substrat für die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase darstellt. Cortison besetzt den MR, aktiviert ihn aber nicht und wirkt so als Antagonist. Für die Überführung von Cortisol in Cortison ist NAD als Cosubstrat notwendig. Wird 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase blockiert, so wird Cortisol zum Agonisten des MR und verschiebt den intrazellulären pH-Wert im gleichen Maß wie Aldosteron. Betrachtet man die Plasmakonzentration, die für Cortisol ca. 100-fach höher ist als für Aldosteron, so erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Änderung des Cortisolgehalts auf diesem Niveau für den Wechsel vom Antagonisten zum Agonisten verantwortlich ist. Vielmehr wurde eine Sensorfunktion des NADH-Gehalts postuliert, der bei Enzymblockade steil abfällt.

Die Behandlung von isolierten Kardiomyozyten aus Kaninchen mit 100 nM Cortisol führte zu keinen agonistischen Effekten und konnte im Gegenteil den agonistischen Effekt von 100 nM Aldosteron auf einen Wert von 10% reduzieren. Die Änderung des intrazellulären Redoxzustandes durch Infusion mit oxidiertem Glutathion führte allein zu keiner Änderung, wurden die Zellen jedoch anschließend mit Cortisol behandelt, so zeigten die Zellen den gleichen Effekt wie für Aldosteron (Funder, 2005). Auf welche Weise der veränderte Redoxzustand den MR-Glukokortikoidkomplex aktiviert, ist noch unklar, jedoch wurden bereits redoxabhängige Transkriptionsänderungen für die Aktivierung von Corepressoren beschrieben (Fjeld *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002)

Ob eine Interaktion von GAPDH mit L-Lactatdehydrogenase unter Aldosteroneinfluss stattfindet, ist nicht bekannt. Schnelle Effekte auf L-Lactatdehydrogenase konnten für Glucocorticoide bereits gezeigt werden. Muskelzellen, die mit dem künstlichen Glucocorticoid Prednison inkubiert wurden, zeigten bereits nach sehr kurzen Inkubationszeiten (5-30 min) Veränderungen im Proteinprofil. Dies betraf z. T. die subzelluläre Lokalisation von vor allem ribosomalen Proteinen und anderen Proteinen, die an der Transkription und Translation beteiligt sind. Daneben waren verschiedene Proteine mit Beteiligung am Zytoskelett betroffen. L-Lactatdehydrogenase, war ebenfalls 2,6fach herunterreguliert (Reeves *et al.*, 2009).

4.4.2. Beta- Aktin im Zusammenhang mit Herzerkrankungen

Kongestive Herzinsuffizienz geht häufig mit einem Hypertonus der Lungengefäße einher. Dabei ist neben dem erhöhten Blutdruck auch der Widerstand der Gefäße von Bedeutung, der im Verlauf der Erkrankung zunimmt. Dabei kommt es zu einer massiven Umbildung der Lungengefäße. Der wachsende Aortendruck begrenzt das Auswurfvermögen der rechten Herzkammer und kann so zu Herzversagen führen (Ghio *et al.*, 2001). Die Herzinsuffizienz kann Funktionsstörungen im Lungenendothel verursachen, so kann z. B. im Tiermodell die Entspannung der Lungenarterie als Reaktion auf Acetylcholin in Abhängigkeit vom Endothel beeinträchtigt sein (Driss *et al.*, 2000). Untersuchungen des Lungenendothels und der Signalwege mithilfe von Echtzeitfluoreszenzaufnahmen zeigen, dass die $[Ca^{2+}]_i$ -Signalwege im Endothel massiv beeinträchtigt sind, was zum Teil auf die Veränderungen im Aktinzytoskelett zurückzuführen ist. Aktinfilamente sind für die intrazelluläre Calciumhomöostase von entscheidender Bedeutung und können sowohl über Liganden-abhängige als auch über TRP-Kanäle den Ca^{2+} -Influx steuern (Ma *et al.*, 2000).

Kerem *et al.* konnten im Tiermodell zeigen, dass die Umbildung im Lungenendothel mit einer verstärkten Expression von Beta-Aktin (13-fach erhöht gegenüber den Kontrollen) einhergeht (Kerem *et al.*, 2010).

Birks *et al.* legten Genprofile der Zytoskelettproteine bei Patienten an, denen Linksherz-unterstützungssysteme eingesetzt wurden. Bei einem Teil der Patienten kam es zu einer Regeneration des Myokards, so dass das System entfernt werden konnte. Andere Patienten benötigten eine Herztransplantation, bei der das Unterstützungssystem ebenfalls wieder entfernt wurde. Von allen Patienten wurden Proben bei der Implantation und der Ex-, bzw. Transplantation genommen, die mithilfe von Proteinchips auf die Expression der Zytoskelettproteine hin untersucht wurden. Die erhaltenen Daten wurden für die Patienten, deren Herz sich erholt hatte, bzw. für die Patienten, die eine Transplantation benötigten, gruppiert und miteinander verglichen. Dabei kam es zu unterschiedlichen Veränderungen in den Gruppen. Während z. B. die Vinculin-Expression in den genesenen Patienten abnahm, kam es bei den übrigen Patienten zu einer vermehrten Expression von Vinculin. Die Expression von Beta-Aktin war dabei ausschließlich in der Patientengruppe, die sich erholt hatte, erhöht. Die Expression lag dabei um den Faktor 1,7 höher als in der Transplantationsgruppe (Birks *et al.*, 2005).

4.4.3 Anorganische Pyrophosphatase (IPP) und Arterienverkalkung

Pyrophosphatasen hydrolysieren Diphosphat zu zwei anorganischen Phosphatmolekülen. In der Spalthefe wurde die Expression der anorganischen Pyrophosphatase durch Aldosteron reprimiert, wobei vor allem ein Zusammenhang mit der Signaltransduktion postuliert wurde (Böhmer, 2005).

In den Zellkulturversuchen war die Expression von IPP auf RNA-Ebene in den Fibroblasten reduziert, in den HL-1 Zellen teils reprimiert, teils aktiviert. Für die HCT-Zellen gab es nach der Spironolactonbehandlung keine Effekte des Aldosterons, der Einfluß war also auf die Herzzellen beschränkt.

In höheren Organismen gibt es neben den Pyrophosphatasen, die die Pyrophosphatkonzentration innerhalb der Zelle regulieren, weitere Enzyme, die einen Einfluss auf die extrazellulären Phosphatverhältnisse nehmen. Hier ist besonders die Ectonukleotidpyrophosphatase (Phosphodiesterase 1, ENPP 1) zu nennen, die durch die Regulation der extrazellulären Phosphatkonzentration einen wesentlichen Inhibitor der Verkalkung der extrazellulären Matrix darstellt.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass homozygote oder verschiedene heterozygote Mutationen im ENPP 1 Gen die Ursache für die infantile Arterienverkalkung darstellen. Bei dieser seltenen autosomal-rezessiv vererbten Krankheit kommt es durch Ablagerungen von Calciumhydroxyapatit zur Verkalkung aller mittleren und großen Arterien und somit zur Zerstörung der Gefäße. Die betroffenen Patienten entwickeln innerhalb der ersten Lebensmonate schwere Herz- und Gefäßerkrankungen und sterben meist innerhalb eines halben Jahres an Herzversagen (Numakura *et al.*, 2006) .

4.4.4 LIS-1 ist Bestandteil des Dynein-Transportsystems

Eukaryontische Zellen verwenden zum Transport zellulärer Bestandteile Motorproteine, die sich entlang der Pfade des Zytoskeletts bewegen. Diese Motorproteine lassen sich in drei Klassen einteilen: Myosine bewegen sich an den Aktinfilamenten entlang, während Kinesine und Dyneine dem Verlauf der Mikrotubuli folgen. Dabei bewegen sich die Kinesine vorwiegend in Richtung der Mikrotubuli-Pluspole, was für gewöhnlich einen Transport in Richtung der Peripherie bedeutet. Das Ziel der Dyneine sind die Minuspole der Mikrotubuli, die in den meisten Zellen in einem Organisationszentrum nahe dem Zellkern zusammenlaufen.

In den meisten Spezies gibt es mehr als 15 verschiedene Dyneine, von denen der Großteil jedoch im Axonem verankert vorliegt. Lediglich zwei Dyneine liegen in mobiler Form vor. Das intraflagellare Transportdynein (ITF) ist dabei ausschließlich für den Transport entlang des Axonems zuständig, so dass alle Transporte durch das Cytoplasma (Organellen, mRNA, Proteine) von einem einzigen cytoplasmatischen Dynein durchgeführt werden. Die Regulation des Dyneintransportes erfolgt über die Interaktion mit verschiedenen Proteinen, die für die Anpassung des Dyneintransportes an die zelluläre Funktion nötig sind.

Das LIS-1 Protein ist Bestandteil des Dynein-aktivierenden Komplexes (Dynaktin), der für die Beladung des Dyneins mit dem zu transportierenden Gut und der Initiierung der Bewegung notwendig ist. Dabei ist LIS-1 das einzige Protein des Komplexes, das direkt an die ATPase Untereinheit des Dyneins bindet und ihre Aktivität beeinflussen kann, wobei sowohl stimulierende (Mesngon *et al.*, 2006) als auch inhibierende Effekte (Yamada *et al.*, 2008) beschrieben werden. Die Inhibierung von Lis-1 führt phänotypisch zu einem vollständigen Ausfall des Dyneintransportes. Die Überexpression von LIS-1 in Zellkulturen führt zu einem verstärkten mitotischen Index der Zellen, dabei treten verschiedene mitotischen Defekte, wie z.B. multipolare Spindeln, und Störungen in der Chromosomensegregation auf (Faulkner *et al.*, 2000). Eine Beeinflussung der LIS-1 Expression durch Aldosteron kann demzufolge über den Dyneintransport von mRNA die Expression weiterer Proteine beeinflussen. In Bezug auf Herzerkrankungen ist eine weitreichende Bedeutung von LIS-1 möglich. Da sowohl die Überexpression als auch die Inhibierung von LIS-1 Störungen der Mitose zur Folge hat, könnte hier ein Zusammenhang mit der Fibrosebildung bestehen.

4.4.5 FKBP & PPIase im Multiproteinkomplex des MR

Steroidrezeptoren liegen im Cytosol in einem Multikomplex mit Chaperonen und Cochaperonen vor. Neben den Hitzeschockproteinen Hsp90 und Hsp70 sind das saure Protein p23 sowie die TPR-Proteine (*tetratricopeptide repeat proteins*), deren Name sich von der wiederholten Sequenz aus 34 Peptiden ableitet. Aus diesen Motiven wird eine Struktur gebildet, mit der Protein-Protein Interaktionen vermittelt werden, sie findet sich häufig beim Aufbau von Multiproteinkomplexen.

Die Steroidrezeptoren sind mit Immunophilinen assoziiert, die PPIase-Aktivität besitzen. In den verschiedenen Komplexen finden sich FKBP51, FKBP52, Cyp-40 und PP5.

FKBP und PPIase sind somit über den Multiproteinkomplex des MR direkt mit der Aldosteronwirkung assoziiert. Die biologische Funktion der Immunophiline im Steroidrezeptorkomplex ist noch nicht klar; man geht jedoch davon aus, dass es sich hierbei nicht um eine Immunsuppression handelt.

Für den Glucocorticoidrezeptor konnte gezeigt werden, dass die Chaperone nicht nur an der Bindung der Steroide, sondern auch an der Translokation in den Zellkern beteiligt sind. FKBP52 kann über Dynamitin mit Dynein interagieren und so den Transport regulieren. Das homologe Protein FKBP51 zeigt in Zellkulturen einen inhibierenden Effekt auf den GR, der darauf zurückgeführt werden kann, dass FKBP51 nicht in der Lage ist, mit Dynein zu interagieren, die Translokation in den Zellkern geschieht dadurch deutlich langsamer (Wochnik *et al.*, 2005).

Auch für den MR konnten eine Dyneinbeteiligung an der Translokation und die unterschiedliche Regulation des Transports durch FKBP52 und FKBP51 nachgewiesen werden (Galigniana *et al.*, 2010).

Eine Veränderung im Expressionsprofil von FKBP / PPIase infolge von Aldosteron könnte demzufolge eine Rückkopplungsreaktion darstellen.

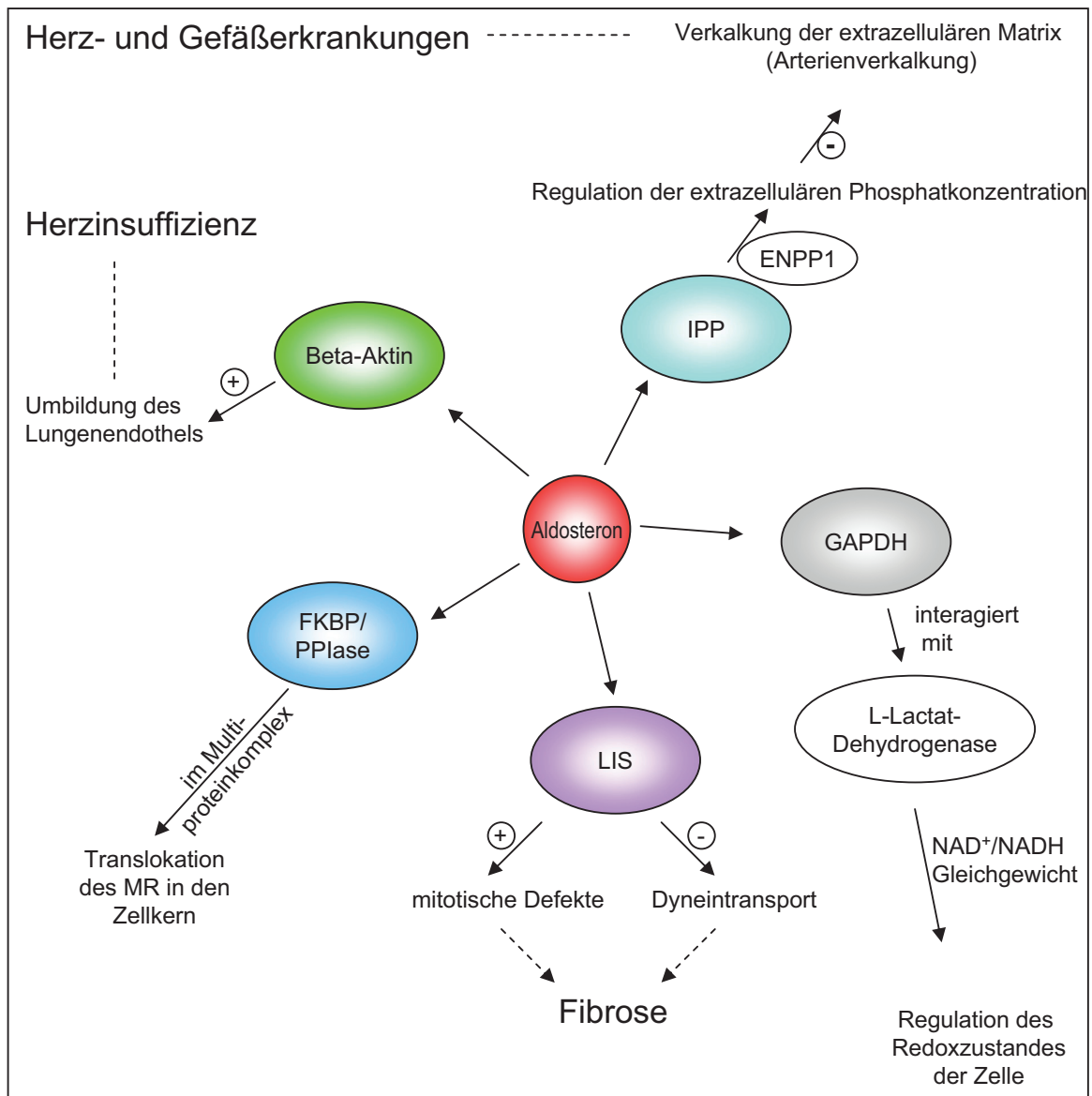


Abb.4.4.1 Von Aldosteron beeinflusste Proteine und ihr Zusammenhang zur Aldosteronwirkung und Herzerkrankungen. (IPP anorganische Pyrophosphatase, ENPP1 Ektonucleotidpyrophosphatase, PPIase Peptidyl-prolyl-*cis-trans*-Isomerase, FKBP FK-bindendes Protein, GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, LIS Lissenzephalie1-Protein) Die Überexpression von LIS führt zu mitotischen Defekten, während die Inhibierung von LIS den Ausfall des Dyneintransports zur Folge hat. Beides kann Fibrosen begünstigen. Zu geringe Phosphatkonzentrationen in der extrazellulären Matrix verursachen Arterienverkalkung und können so zu Herz- und Gefäßerkrankungen führen. In verändertem Lungenepithel, wie es bei kongestiver Herzinsuffizienz auftritt, konnte die erhöhte Expression von Beta-Aktin nachgewiesen werden. FKBP und PPIase sind Bestandteile des Multiproteinkomplexes, der für die Translokation des MR in den Zellkern verantwortlich ist. Die verringerte Expression von FKBP & PPIase durch Aldosteroneinfluss könnte Teil einer negativen Rückkopplung sein. Über die Interaktion von GAPDH mit L-Lactatdehydrogenase kann über die Veränderung des NAD⁺/NADH-Gleichgewichtes der Redoxzustand der Zelle reguliert werden. Die Ektonucleotidpyrophosphatase inhibiert durch die Regulation der extrazellulären Phosphatkonzentration die Verkalkung der extrazellulären Matrix.

4.5 Fazit & Ausblick

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Effekte des Aldosterons auf das Proteom der Spalthefe. Da die Hefe natürlicherweise über keinen MR verfügt, konnten alle beobachteten Effekte auf eine Vermittlung unabhängig vom MR zurückgeführt werden. Dabei wurde eine Reihe von Kandidaten identifiziert, von denen zunächst einige im Mammaliensystem untersucht werden sollten, um zu prüfen, ob Aldosteron einen Einfluss auf ihre Expression ausübt. Über den untersuchten Zeitverlauf konnten auf RNA-Ebene insgesamt 85 Datensätze mit statistisch signifikanten Unterschieden in der Expression zwischen der Kontrolle und den Aldosteronproben bestimmt werden.

In 36 Fällen konnte eine Vermittlung des Effektes über den MR postuliert werden, da nach der Vorbehandlung mit Spironolacton keine Unterschiede zwischen Aldosteron und den Kontrollen nachgewiesen werden konnten.

Unabhängig von der Spironolactonbehandlung traten die gleichen Aldosteroneffekte in 33 Fällen auf, dabei lag der Anteil der bestätigten Unterschiede für alle verwendeten Zelllinien ungefähr gleich hoch. In den übrigen 16 Fällen zeigten die Kombinationsproben aus Spironolacton und Aldosteron einen umgekehrten Effekt im Vergleich zum Aldosteron. Diese Fälle waren nicht gleichmäßig über die verschiedenen Zellen verteilt. Für die Fibroblasten trat dieser Umkehreffekt nur in einem Fall auf. Die Expression von GAPDH war bei unterschiedlichen Inkubationszeiten beeinflusst. Dabei traten nach 60 und 150 Minuten die gleichen Aldosteroneffekte mit und ohne Spironolactonbehandlung auf. Nach 180 Minuten kam es zur Umkehrung des Effekts, nach 210 Minuten konnte nach der Spironolactonbehandlung kein Aldosteroneffekt mehr beobachtet werden.

Für die HL-1 Zellen lag das Verhältnis zwischen umgekehrten und gleichen Effekten bei ungefähr 1:4, bei den HCT 116-Zellen entfielen im Vergleich dazu 12 Fälle mit umgekehrtem Effekt auf 13 Fälle mit gleichem Effekt.

In den Fibroblasten und den HL-1 Zellen konnten bei allen Kandidaten Bedingungen gefunden werden, bei denen es zu den gleichen Aldosteroneffekten unabhängig von der Vorbehandlung mit Spironolacton kam. Für die HCT-Zellen war dies für GAPDH, Beta-Aktin LIS, FKBP und PPIase ebenfalls möglich, für IPP jedoch traten nach der Vorbehandlung mit Spironolacton keine Aldosteroneffekte auf.

Für die Fibroblasten gab es einen klaren Schwerpunkt auf den frühen Inkubationszeiten. Nach 60 Minuten Inkubationszeit waren 5 der 6 Kandidaten in der Expression geändert, für LIS, IPP und GAPDH zeigte sich ein Einfluss auch noch nach 150 Minuten, nach längeren Inkubationszeiten konnten keine Unterschiede mehr nachgewiesen werden. In den HL-1 Zellen trat die Hälfte der beobachteten Veränderungen bis 90 Minuten ein, die andere Hälfte entfiel auf Inkubationszeiten zwischen 150 und 240 Minuten. Für die HCT116-Zellen gab es

4. DISKUSSION

einen frühen Schwerpunkt nach 45, bzw. 60 Minuten, jedoch gab es für alle der bestätigten Kandidaten noch mindestens einen späteren Zeitpunkt, zu dem veränderte Expression auftrat. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien können verschiedene Ursachen haben. Die Fibroblasten und die HL-1 Zellen sind sich ähnlicher als den HCT116 Zellen. Beides sind im Gegensatz den HCT116 Zellen Herzzellen, die Ähnlichkeiten können aber auch phylogenetischen Ursprungs sein. Die Fibroblasten sind aus neonatalen Rattenherzen präpariert, die HL-1 Zellen stammen aus Mäusen, die Verwandtschaft zwischen diesen Zellen ist also enger als zu den HCT116-Zellen, die aus einem humanen Kolonkarzinom entstammen. Auch in Bezug auf das Zellalter sind sich die beiden Nagerzellen ähnlicher.

Hinsichtlich des Zelltyps unterscheiden sich alle drei Zelllinien voneinander, neben den Fibroblasten handelt es sich bei HCT116 Zellen um epitheliale Zellen, die HL-1 Zellen entsprechen in ihrem Aufbau den Herzmuskelzellen. Von Bedeutung sein könnte ebenfalls, dass es sich bei den Fibroblasten nicht um immortalisierte Zellen handelt, hier wäre es denkbar, dass die Fibroblasten aufgrund zellulärer Signalwege, die in den Tumorzellen nicht mehr gesteuert werden können, zu den späteren Zeiten keine veränderte Expression mehr zeigen. Nicht-genomische Effekte klassischer Steroidrezeptoren können z. B. über Proteinkinase C, MAP-Kinase oder die Phosphoinositid-3-Kinasen vermittelt werden. Die Störung jedes einzelnen dieser Signalwege kann zur Tumorentstehung führen, es ist bekannt, dass die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges über Mitogene in 30 % der Krebsarten hyperaktiviert ist (Pearson *et al.*, 2001).

In der Spalthefe war die PPlase aktiviert, während alle anderen Änderungen Reprimierungen darstellten. In den Zelllinien trat ebenfalls häufiger eine verminderte Expression auf, von 33 Fällen, in denen unabhängig vom Spironalacton eine Veränderung der Expression durch Aldosteron auftritt, ist nur in 5 Fällen die Expression gegenüber den Kontrollen erhöht.

Der Einfluss des Aldosterons auf die Expression konnte auf der RNA-Ebene besser abgebildet werden als auf der Proteinebene, hier gibt es deutlich weniger Ergebnisse, die für Aldosteron und die Kombinationsprobe die gleichen Ergebnisse unterschiedlich zu den Kontrollen zeigen. RNA- und Proteindaten korrelieren dabei in der Regel nicht. Allein schon aufgrund der räumlichen Trennung von Transkription und Translation in Eukaryonten war eine zeitgleiche Reaktion auch nicht zu erwarten.

Für LIS konnte zu einem Zeitpunkt eine verminderte Expression auf RNA-Ebene bei gleichzeitiger erhöhter Expression auf Proteinebene unter Aldosteroneinfluss gefunden werden. Sowohl RNA- als auch Proteindaten schwanken im Zeitverlauf über einen großen dynamischen Bereich.

Es konnte für alle untersuchten Kandidaten ein Aldosteroneinfluss auf die Expression auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf den frühen Inkubationszeiten (bis 90 min), hier tritt im Allgemeinen eine verminderte Expression unter

4. DISKUSSION

Aldosteroneinfluss auf, während es zu einem späteren Zeitpunkt auch zu erhöhter Expression im Vergleich zu den Kontrollen kommen kann.

Die unterschiedlichen Reaktionen in den untersuchten Zellkultursystemen, der große dynamische Bereich, über den die Daten verteilt vorliegen und die unterschiedliche Beziehung zwischen RNA und Proteindaten zeichnen ein komplexes Bild des Einflusses von Aldosteron auf die Expression der ausgewählten Proteine. Für alle Kandidaten lassen sich anhand der Literatur Verbindungen zur Aldosteronwirkung und teilweise zu Herzerkrankungen erstellen, eine Beteiligung der Kandidaten an der Vermittlung potentiell herzscheidender Aldosteroneffekte ist somit möglich.

Die komplexe Datenlage und insbesondere die Unterschiede in der Regulationsrichtung lassen sich dadurch jedoch nicht schlüssig erklären. Um eine Einordnung und Gewichtung der statistisch signifikanten Daten in die Gesamtdaten zuverlässig zu erlauben, wäre es nötig, weitere Untersuchungen durchzuführen, die sich jedoch nicht auf Aldosteron konzentrieren, sondern mit der Dynamik der Expression im Allgemeinen auseinandersetzen sollten. Während Zellkulturen gegenüber den Hefezellen den Vorteil haben, hinsichtlich der Fragestellung einer Beziehung des Aldosterons zu Herzerkrankungen näher an der physiologischen Realität zu liegen, erlauben es die Rahmenbedingungen beim Umgang mit adhärennten Zellen nicht, über einen Zeitverlauf kontinuierlich Proben aus der gleichen Grundmenge zu entnehmen, ohne die Zellen dabei massivem Stress auszusetzen.

Der Umgang mit Modellorganismen und experimentellen Rahmenbedingungen erfordert vor allem die kritische Beurteilung der erhaltenen Daten, deren mögliche Interpretation im vorliegenden Fall wesentlich davon abhängt, zu welcher Inkubationszeit die Untersuchung durchgeführt wird.

Eine eindeutige Interpretation der Daten ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich, zukünftige Erkenntnisse werden eine Einordnung sicherlich erleichtern. Unsere Kenntnis von den Vorgängen in der lebenden Zelle ist in vielen Fällen sehr detailliert, die Komplexität selbst einfacher biologischer Systeme stellt jedoch auch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nach wie vor eine große Herausforderung dar.

5. LITERATUR

- Arnold, H., Pette, D., 1968. Binding of Glycolytic Enzymes to Structure Proteins of Muscle. *Eur J Biochem* 6, 163-171.
- Beggah, A.T., Escoubet, B., Puttini, S., Cailmail, S., Delage, V., Ouvrard-Pascaud, A., Bocchi, B., Peuchmaur, M., Delcayre, C., Farman, N., Jaisser, F., 2002. Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29, A85-A85.
- Birks, E.J., Hall, J.L., Barton, P.J.R., Grindle, S., Latif, N., Hardy, J.P., Rider, J.E., Banner, N.R., Khaghani, A., Miller, L.W., Yacoub, M.H., 2005. Gene profiling changes in cytoskeletal proteins during clinical recovery after left ventricular-assist device support. *Circulation* 112, I57-I64.
- Böhmer, S., 2005. Nachweis von Kern-Rezeptor unabhängigen Effekten des Aldosterons auf das Proteom der Spaltheife mittels 2D-Elektrophorese und Massenspektrometrie. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Böhmer, S., Carapito, C., Wilzewski, B., Leize, E., Van Dorsselaer, A., Bernhardt, R., 2006. Analysis of aldosterone-induced differential receptor-independent protein patterns using 2D-electrophoresis and mass spectrometry. *Biol Chem* 387, 917-929.
- Brilla, C.G., Matsubara, L.S., Weber, K.T., 1993a. Anti-Aldosterone Treatment and the Prevention of Myocardial Fibrosis in Primary and Secondary Hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 25, 563-575.
- Brilla, C.G., Matsubara, L.S., Weber, K.T., 1993b. Antifibrotic Effects of Spironolactone in Preventing Myocardial Fibrosis in Systemic Arterial-Hypertension. *Am J Cardiol* 71, A12-A16.
- Bureik, M., Brück, N., Hubel, K., Bernhardt, R., 2005. The human mineralocorticoid receptor only partially differentiates between different ligands after expression in fission yeast. *FEMS Yeast Res* 5, 627-633.
- Chalmers, J.A., Martino, T.A., Tata, N., Ralph, M.R., Sole, M.J., Belsham, D.D., 2008. Vascular circadian rhythms in a mouse vascular smooth muscle cell line (Movas-1).

5. LITERATUR

- American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology 295, R1529-R1538.
- Christ, M., Gunther, A., Heck, M., Schmidt, B.M.W., Falkenstein, E., Wehling, M., 1999. Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 99, 1485-1491.
- Christ, M., Meyer, C., Sippel, K., Wehling, M., 1995. Rapid Aldosterone Signaling in Vascular Smooth-Muscle Cells - Involvement of Phospholipase-C, Diacylglycerol and Protein-Kinase-C-Alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 213, 123-129.
- Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., Izzo, N.J., 1998. HL-1 cells: A cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2979-2984.
- Davis, J.O., Freeman, R.H., 1976. Mechanisms Regulating Renin Release. *Physiol Rev* 56, 1-56.
- Davis, L., Smith, G.R., 2001. Meiotic recombination and chromosome segregation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8395-8402.
- Delcayre, C., Silvestre, J.S., 1999. Aldosterone and the heart: towards a physiological function? *Cardiovasc Res* 43, 7-12.
- Dragan, C.A., Zearo, S., Hannemann, F., Bernhardt, R., Bureik, M., 2005. Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 5, 621-625.
- Driss, A.B., Devaux, C., Henrion, D., Duriez, M., Thuillez, C., Levy, B.I., Michel, J.B., 2000. Hemodynamic stresses induce endothelial dysfunction and remodeling of pulmonary artery in experimental compensated heart failure. *Circulation* 101, 2764-2770.
- Eyles, S.J., Gierasch, L.M., 2000. Multiple roles of prolyl residues in structure and folding. *J Mol Biol* 301, 737-747.

5. LITERATUR

- Fakitsas, P., Adam, G., Daidie, D., van Bemmelen, M.X., Fouladkou, F., Patrignani, A., Wagner, U., Warth, R., Camargo, S.M.R., Staub, O., Verrey, F., 2007. Early aldosterone-induced gene product regulates the epithelial sodium channel by deubiquitylation. *J Am Soc Nephrol* 18, 1084-1092.
- Fantes, P.A., 1977. Control of Cell-Size and Cycle Time in *Schizosaccharomyces-Pombe*. *J Cell Sci* 24, 51-67.
- Faulkner, N.E., Dujardin, D.L., Tai, C.Y., Vaughan, K.T., O'Connell, C.B., Wangs, Y.L., Vallee, R.B., 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* 2, 784-791.
- Ferreira, P.A., Nakayama, T.A., Pak, W.L., Travis, G.H., 1996. Cyclophilin-related protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin. *Nature* 383, 637-640.
- Fjeld, C.C., Birdsong, W.T., Goodman, R.H., 2003. Differential binding of NAD(+) and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9202-9207.
- Funder, J.W., 2005a. Mineralocorticoid receptors: Distribution and activation. *Heart Fail Rev* 10, 15-22.
- Funder, J.W., 2005b. RALES, EPHESUS and redox. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 121-125.
- Funder, J.W., Pearce, P.T., Smith, R., Smith, A.I., 1988. Mineralocorticoid Action - Target Tissue-Specificity is Enzyme, not Receptor, Mediated. *Science* 242, 583-585.
- Galat, A., 2003. Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerases (Immunophilins): Biological Diversity - Targets - Functions. *Curr Top Med Chem* 3, 1315-1347.
- Galigniana, M.D., Erlejman, A.G., Monte, M., Gomez-Sanchez, C., Piwien-Pilipuk, G., 2010. The hsp90-FKBP52 Complex Links the Mineralocorticoid Receptor to Motor Proteins and Persists Bound to the Receptor in Early Nuclear Events. *Mol Cell Biol* 30, 1285-1298.

5. LITERATUR

- Gekle, M., Golenhofen, N., Oberleithner, H., Silbernagl, S., 1996. Rapid activation of Na⁺/H⁺ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca²⁺ and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10500-10504.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., Laudet, V., 2006. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58, 685-704.
- Ghio, S., Gavazzi, A., Campana, C., Inserra, C., Klersy, C., Sebastiani, R., Arbustini, E., Recusani, F., Tavazzi, L., 2001. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 37, 183-188.
- Glick, B.S., 1996. Cell biology: Alternatives to baker's yeast. *Curr Biol* 6, 1570-1572.
- Goidin, D., Mamessier, A., Staquet, M.J., Schmitt, D., Berthier-Vergnes, O., 2001. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem* 295, 17-21.
- Gomez-Sanchez, E.P., 2010. The mammalian mineralocorticoid receptor: tying down a promiscuous receptor. *Exp Physiol* 95, 13-18.
- Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.M., Plonczynski, M., Gomez-Sanchez, C.E., 2010. Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension. *Exp Physiol* 95, 120-130.
- Gordon, C.B., Fantes, P.A., 1986. The Cdc22 Gene of Schizosaccharomyces-Pombe Encodes a Cell Cycle-Regulated Transcript. *EMBO J* 5, 2981-2985.
- Hackenthal, E., Paul, M., Ganten, D., Taugner, R., 1990. Morphology, Physiology, and Molecular-Biology of Renin Secretion. *Physiol Rev* 70, 1067-1116.
- Hägström, M., 2009. Abbildung: Humane Steroidbiosynthese in: Steroid. (20.03.2009) In Wikipedia, The Free Encyclopedia.
<http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Steroid&oldid=438033296>.

5. LITERATUR

- Hansen, E.H., Moller, B.L., Kock, G.R., Bunner, C.M., Kristensen, C., Jensen, O.R., Okkels, F.T., Olsen, C.E., Motawia, M.S., Hansen, J., 2009. De Novo Biosynthesis of Vanillin in Fission Yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) and Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Appl Environ Microbiol* 75, 2765-2774.
- Haseroth, K., Gerdes, D., Berger, S., Feuring, M., Gunther, A., Herbst, C., Christ, M., Wehling, M., 1999. Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 266, 257-261.
- Holley, R.W., Kiernan, J.A., 1968. Contact Inhibition of Cell Division in 3t3 Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 300-304.
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S., 1987. Mechanisms of Endothelium-Dependent Vascular Smooth-Muscle Relaxation Elicited by Bradykinin and Vip. *Am J Physiol* 253, H1074-H1082.
- Ivanova, L., Bernhardt, R., Bernhardt, I., 2008. Nongenomic effect of aldosterone on ion transport pathways of red blood cells. *Cell Physiol Biochem* 22, 269-278.
- Iyer, V.R., Eisen, M.B., Ross, D.T., Schuler, G., Moore, T., Lee, J.C.F., Trent, J.M., Staudt, L.M., Hudson, J., Boguski, M.S., Lashkari, D., Shalon, D., Botstein, D., Brown, P.O., 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283, 83-87.
- Jungbluth, A., 2000. Funktionelle Charakterisierung des vip-1 Proteins der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Kent, R.B., Guterman, S.K., 1982. Pyrophosphate Inhibition of Rho-Atpase - a Mechanism of Coupling to Rna-Polymerase Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 79, 3992-3996.
- Kerem, A., Yin, J., Kaestle, S.M., Hoffmann, J., Schoene, A.M., Singh, B., Kuppe, H., Borst, M.M., Kuebler, W.M., 2010. Lung Endothelial Dysfunction in Congestive Heart Failure Role of Impaired Ca²⁺ Signaling and Cytoskeletal Reorganization. *Circ Res* 106, 1103-U1235.

5. LITERATUR

- Klein, K., Henk, W., 1963. Klinisch-experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Aldosteron auf Hämodynamik und Gerinnung. *Z Kreislaufforsch* 52, 40-53.
- Krajewski, S., Zapata, J.M., Reed, J.C., 1996. Detection of multiple antigens on western blots. *Anal Biochem* 236, 221-228.
- Kues, W.A., Anger, M., Carnwath, J.W., Paul, D., Motlik, J., Niemann, H., 2000. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: Effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod* 62, 412-419.
- Lahti, R., Pitkaranta, T., Valve, E., Ilta, I., Kukkokalske, E., Heinonen, J., 1988. Cloning and Characterization of the Gene Encoding Inorganic Pyrophosphatase of *Escherichia-Coli* K-12. *J Bacteriol* 170, 5901-5907.
- Lämmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laschet, J.J., Minier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M.H., Trottier, S., Jeanneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., Van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P., Pumain, R., 2004. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABA(A) receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J Neurosci* 24, 7614-7622.
- Lauer, B.J., Wörner, M., Bernhardt, R., 2009. Cloning and heterologous expression in *Escherichia coli* of the fission yeast *vip1* gene, showing differential expression after aldosterone treatment. *C R Chim* 12, 1127-1139.
- Lijnen, P., Petrov, V., 2000. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 32, 865-879.
- Lijnen, P.J., Petrov, V.V., Fagard, R.H., 2000. Induction of cardiac fibrosis by angiotensin II. *Methods Finds Exp Clin Pharmacol* 22, 709-723.
- Lisurek, M., Bernhardt, R., 2004. Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. *Mol Cell Endocrinol* 215, 149-159.

5. LITERATUR

- Liu, S.L., Schmuck, S., Chorazczyewski, J.Z., Gros, R., Feldman, R.D., 2003. Aldosterone regulates vascular reactivity - Short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation* 108, 2400-2406.
- Lombes, M., Binart, N., Delahaye, F., Baulieu, E.E., Rafestinoblin, M.E., 1994. Differential Intracellular-Localization of Human Mineralocorticosteroid Receptor on Binding of Agonists and Antagonists. *Biochem J* 302, 191-197.
- Lösel, R., Wehling, M., 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-56.
- Ma, H.T., Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., Gill, D.L., 2000. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* 287, 1647-1651.
- Mesngon, M.T., Tarricone, C., Hebbar, S., Guillotte, A.M., Schmitt, E.W., Lanier, L., Musacchio, A., King, S.J., Smith, D.S., 2006. Regulation of cytoplasmic dynein ATPase by Lis1. *J Neurosci* 26, 2132-2139.
- Meyer, C., Schmid, R., Scriba, P.C., Wehling, M., 1996. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* 239, 726-731.
- Meyersiegler, K., Mauro, D.J., Seal, G., Wurzer, J., Deriel, J.K., Sirover, M.A., 1991. A Human Nuclear Uracil DNA Glycosylase Is the 37-KDa Subunit of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8460-8464.
- Naray-Fejes-Toth, A., Fejes-Toth, G., 2000. The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int* 57, 1290-1294.
- Nguyen, H.H., Hannemann, F., Hartmann, M.F., Wudy, S.A., Bernhardt, R., 2008. Aldosterone synthase deficiency caused by L451F mutation in the CYP11B2 a homozygous gene. *Mol Genet Metab* 93, 458-467.

5. LITERATUR

- Numakura, C., Yamada, M., Ariyasu, D., Maesaka, A., Kobayashi, H., Nishimura, G., Ikeda, M., Hasegawa, Y., 2006. Genetic and enzymatic analysis for two Japanese patients with idiopathic infantile arterial calcification. *J Bone Miner Metab* 24, 48-52.
- Obama, K., Kato, T., Hasegawa, S., Satoh, S., Nakamura, Y., Furukawa, Y., 2006. Overexpression of Peptidyl-Prolyl Isomerase-Like 1 Is Associated with the Growth of Colon Cancer Cells. 10.1158/1078-0432.CCR-05-0588. *Clin Cancer Res* 12, 70-76.
- Pancholi, V., Fischetti, V.A., 1992. A Major Surface Protein on Group-a Streptococci Is a Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase with Multiple Binding-Activity. *J Exp Med* 176, 415-426.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T.B., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M.H., 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Pedrali-Noy, G., Spadari, S., Millerfaures, A., Miller, A.O.A., Kruppa, J., Koch, G., 1980. Synchronization of Hela-Cell Cultures by Inhibition of DNA Polymerase-Alpha with Aphidicolin. *Nucleic Acids Res* 8, 377-387.
- Peller, L., 1976. Free-Energy Changes in Synthesis and Degradation of Nucleic-Acids. *Biochemistry* 15, 141-146.
- Pereira, R.M., dos Santos, R.A.S., Dias, F.L.D., Teixeira, M.M., Silva, A., 2009. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 15, 2579-2586.
- Perez-Castineira, J.R., Lopez-Marques, R.L., Villalba, J.M., Losada, M., Serrano, A., 2002. Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and plant H⁺-translocating pyrophosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15914-15919.
- Pitt, B., 2005. The role of aldosterone blockade in patients with heart failure. *Heart Fail Rev* 10, 79-83.
- Pitt, B., Williams, G., Remme, W., Martinez, F., Lopez-Sendon, J., Zannad, F., Neaton, J., Roniker, B., Hurley, S., Burns, D., Bittman, R., Kleiman, J., 2001. The EPHEsus trial:

5. LITERATUR

- Eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 15, 79-87.
- Reeves, E.K.M., Gordish-Dressman, H., Hoffman, E.P., Hathout, Y., 2009. Proteomic profiling of glucocorticoid-exposed myogenic cells: Time series assessment of protein translocation and transcription of inactive mRNAs. *Proteome Science* 7.
- Remacle, J.E., Albrecht, G., Brys, R., Braus, G.H., Huylebroeck, D., 1997. Three classes of mammalian transcription activation domain stimulate transcription in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 16, 5722-5729.
- Rossol-Haseroth, K., Zhou, Q., Braun, S., Boldyreff, B., Falkenstein, E., Wehling, M., Losel, R.M., 2004. Mineralocorticoid receptor antagonists do not block rapid ERK activation by aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun* 318, 281-288.
- Saithong, P., Nakamura, T., Shima, J., 2009. Prevention of bacterial contamination using acetate-tolerant *Schizosaccharomyces pombe* during bioethanol production from molasses. *J Biosci Bioeng* 108, 216-219.
- Sale, F.O., Vanzulli, E., Caielli, S., Taramelli, D., 2005. Regulation of human erythrocyte glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by ferriprotoporphyrin IX. *FEBS Lett* 579, 5095-5099.
- Schmidt, B.M.W., Gerdes, D., Feuring, M., Falkenstein, E., Christ, M., Wehling, M., 2000. Rapid, nongenomic steroid actions: A new age? *Front Neuroendocrinol* 21, 57-94.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46, 69-81.
- Schultz, D.E., Hardin, C.C., Lemon, S.M., 1996. Specific interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with the 5'-nontranslated RNA of hepatitis A virus. *J Biol Chem* 271, 14134-14142.
- Selvey, S., Thompson, E.W., Matthaei, K., Lea, R.A., Irving, M.G., Griffiths, L.R., 2001. beta-actin - an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 15, 307-311.

5. LITERATUR

- Selye, H., 1942. Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* 30, 437-453.
- Shedden, E.A., Wargent, E.T., Ashton, N., Balment, R.J., 2002. Rapid stimulation of cyclic AMP production by aldosterone in rat inner medullary collecting ducts. *J Endocrinol* 175, 343-347.
- Silvestre, J.S., Heymes, C., Oubenaissa, A., Robert, V., Aupetit-Faisant, B., Carayon, A., Swynghedauw, B., Delcayre, C., 1999. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction - Effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 99, 2694-2701.
- Silvestre, J.S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J.M., Swynghedauw, B., Delcayre, C., 1998. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat - Physiological regulation. *J Biol Chem* 273, 4883-4891.
- Sonder, S.U.S., Mikkelsen, M., Rieneck, K., Hedegaard, C.J., Bendtzen, K., 2006a. Effects of spironolactone on human blood mononuclear cells: mineralocorticoid receptor independent effects on gene expression and late apoptosis induction. *Br J Pharmacol* 148, 46-53.
- Sonder, S.U.S., Woetmann, A., Odum, N., Bendtzen, K., 2006b. Spironolactone induces apoptosis and inhibits NF-kappa B independent of the mineralocorticoid receptor. *Apoptosis* 11, 2159-2165.
- Spach, C., Streeten, D.H., 1964. Retardation of Sodium Exchange in Dog Erythrocytes by Physiological Concentrations of Aldosterone in Vitro. *J Clin Invest* 43, 217-227.
- Struthers, A.D., 1996. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure. *J Card Fail* 2.
- Sukumaran, S., Almon, R.R., DuBois, D.C., Jusko, W.J., 2010. Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Adv Drug Delivery Rev* 62, 904-917.
- Sun, Y., Ramires, F.J.A., Weber, K.T., 1997. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res* 35, 138-147.

5. LITERATUR

- Svedruzic, Z.M., Spivey, H.O., 2006. Interaction between mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and L-lactate dehydrogenase from heart and muscle. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 63, 501-511.
- Teng, Q., Huang, W.L., Collette, T.W., Ekman, D.R., Tan, C., 2009. A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics* 5, 199-208.
- Terao, Y., Yamaguchi, M., Hamada, S., Kawabata, S., 2006. Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J Biol Chem* 281, 14215-14223.
- Wang, X.J., Etzkorn, F.A., 2006. Peptidyl-prolyl isomerase inhibitors. *Peptide Science* 84, 125-146.
- Wehling, M., Armanini, D., Strasser, T., Weber, P.C., 1987. Effect of Aldosterone on Sodium and Potassium Concentrations in Human Mononuclear Leukocytes. *Am J Physiol* 252, E505-E508.
- Wehling, M., Christ, M., Theisen, K., 1992. Membrane-Receptors for Aldosterone - a Novel Pathway for Mineralocorticoid Action. *Am J Physiol* 263, E974-E979.
- Wehling, M., Kasmayr, J., Theisen, K., 1991. Rapid Effects of Mineralocorticoids on Sodium-Proton Exchanger - Genomic or Nongenomic Pathway. *Am J Physiol* 260, E719-E726.
- Wehling, M., Kuhls, S., Armanini, D., 1989. Volume Regulation of Human-Lymphocytes by Aldosterone in Isotonic Media. *Am J Physiol* 257, E170-E174.
- Westcott, K.V., Huang, B.S., Leenen, F.H.H., 2009. Brain renin-angiotensin-aldosterone system and ventricular remodeling after myocardial infarct: a review. *Can J Physiol Pharmacol* 87, 979-988.
- White, P.C., 1994. Mechanisms of Disease - Disorders of Aldosterone Biosynthesis and Action. *N Engl J Med* 331, 250-258.

5. LITERATUR

- Whitnall, M.H., 1993. Regulation of the Hypothalamic Corticotropin-Releasing Hormone Neurosecretory-System. *Prog Neurobiol* 40, 573-629.
- Williams, G., 2005. Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Fail Rev* 10, 7-13.
- Williams, J.S., Williams, G.H., 2003. 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2364-2372.
- Wilson-Grady, J.T., Villen, J., Gygi, S.P., 2008. Phosphoproteome analysis of fission yeast. *J Proteome Res* 7, 1088-1097.
- Wochnik, G.M., Ruegg, J., Abel, G.A., Schmidt, U., Holsboer, F., Rein, T., 2005. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* 280, 4609-4616.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Fritzc, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerrutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R.,

5. LITERATUR

- Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G., Nurse, P., 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-880.
- Xu, X.D., Xie, Q.G., McClung, C.R., 2010. Robust Circadian Rhythms of Gene Expression in *Brassica rapa* Tissue Culture. *Plant Physiol* 153, 841-850.
- Yamada, M., Toba, S., Yoshida, Y., Haratani, K., Mori, D., Yano, Y., Mimori-Kiyosue, Y., Nakamura, T., Itoh, K., Fushiki, S., Setou, M., Wynshaw-Boris, A., Torisawa, T., Toyoshima, Y.Y., Hirotsune, S., 2008. LIS1 and NDEL1 coordinate the plus-end-directed transport of cytoplasmic dynein. *EMBO J* 27, 2471-2483.
- Yi, P., Wu, R.C., Sandquist, J., Wong, J.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., Means, A.R., O'Malley, B.W., 2005. Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol Cell Biol* 25, 9687-9699.
- Zhang, Q.H., Piston, D.W., Goodman, R.H., 2002. Regulation of corepressor function by nuclear NADH. *Science* 295, 1895-1897.
- Zhou, G.P., Kandala, J.C., Tyagi, S.C., Katwa, L.C., Weber, K.T., 1996. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 154, 171-178.

6. Anhang

Tab.6.1 Liste der verwendeten Primer

GAPDH	MMR GAPDH-vor	GCCAAAAGGGTCATCATCTC
	Mensch GAPDH-rück	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
	Maus GAPDH rück	CCTTCCACAATGCCAAAGTT
	Ratte GAPDH-rück	ATGCCAAAGTTGTCATGGA
β-Aktin	MMR β -Aktin vor	TGACCCAGATCATGTTTGAGA
	Mensch β -Aktin rück	AGGGCATACCCCTCGTAGAT
	Maus β -Aktin rück	GGAGAGCATAGCCCTCGTAG
	Ratte β -Aktin rück	GAGCGCGTAACCCTCATAGA
IPP	Mensch PP vor	GGTTCCTGATGGAAAACCAG
	Mensch PP rück	AAAGCATCCACAATGGCTCT
	Maus PP vor	AAAGCACCCACGATTATTGG
	Maus PP rück	AGGCAGATTCACATGGTGTT
	Ratte PP vor	CACCCACGATTATTGGAAGG
	Ratte PP rück	ACCATTTATCCACGTCCATTG
LIS	Mensch LIS-1 vor	ACCCTCGTGGGTTCATGATAA
	Mensch LIS-1 rück	GACATAGGGTGCCGTCTTGT
	Maus LIS-1 vor	AGCAACAAAGGAATGCAAGG
	Maus LIS-1 rück	CCCAGTTATCATGACCCACA
	Ratte LIS-1 vor	AATGCATCAGAACCATGCAC
	Ratte LIS-1 rück	CAACCCATACACGCACAGTC
FKBP	Hs_ FKBP4_ vor	ATGAGGGTGCTATCGTGGAG
	Hs_ FKBP4_ rück	CATTTGGTGGGATTTGGAAC
	Mm_ FKBP4_ vor	AGTGTGGGGAAGGAGAGGTT
	Mm_ FKBP4_ rück	GCCTGCTTGTACTTGCCTTC
	Rn_ FKBP_ vor	CGTGCTCAAGGTCATCAAGA
	Rn_ FKBP_ rück	GTAGGCGTATTCTGGCTTGC
PPIase	Hs_ PPIA_ vor	TTCATCTGCACTGCCAAGAC
	Hs_ PPIA_ rück	TCGAGTTGTCCACAGTCAGC
	Mm_ PPIA_ vor	CCAAGACTGAATGGCTGGAT
	Mm_ PPIA_ rück	TTACAGGACATTGCGAGCAG
	Rn_ PPIA_ vor	AGCACTGGGGAGAAAGGATT
	Rn_ PPIA_ rück	AGCCACTCAGTCTTGGCAGT

6. ANHANG

Rps27	Mensch-rps27-vor	GACCTACGCACACGAGAACA
	Nager-rps27-vor	GTGACGACCTCCCTACGAGA
	MMR-rps27-rück	CGTTTGTGCATGGCTAAAGA
Rpl27	MMR-rpl27-hin	GCAAGAAGAAGATCGCCAAG
	Mensch-rpl27-rück	AAACCGCAGTTTCTGGAAGA
	Nager-rpl27-rück	TCGCTCCTCAAACCTTGACCT
Arbp/ rplp0	Mensch-rplpo-vor	TCGACAATGGCAGCATCTAC
	Mensch-rplp0-rück	GCCTTGACCTTTTCAGCAAG
	Maus-arbp-vor	CAACCCAGCTCTGGAGAAAC
	Maus-arbp-rück	CAATGGTGCCTCTGGAGATT
	Ratte-arbp-vor	CCTCACCGAGATTAGGGACA
	Ratte-arbp-rück	ATCGCTCAGGATTTCAATGG
Längenstandards	LS163-vor	CTACCAGCGGTGGTTTGTTT
	LS163-rück	GCAGAGCGAGGTATGTAGGC
	LS199-vor	AACGTCGTGACTGGGAAAAC
	LS199-rück	TGACGTATGCGGTGTGAAAT
	LS249-vor	CTGGCGTAATAGCGAAGAGG
	LS249-rück	AGGGAAGAAAGCGAAAGGAG

6. ANHANG

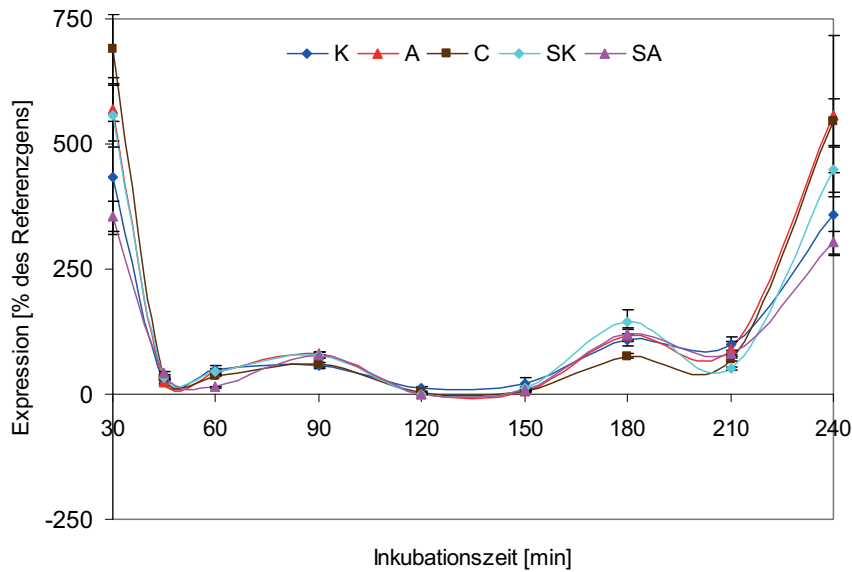


Abb.6.1 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von IPP in Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

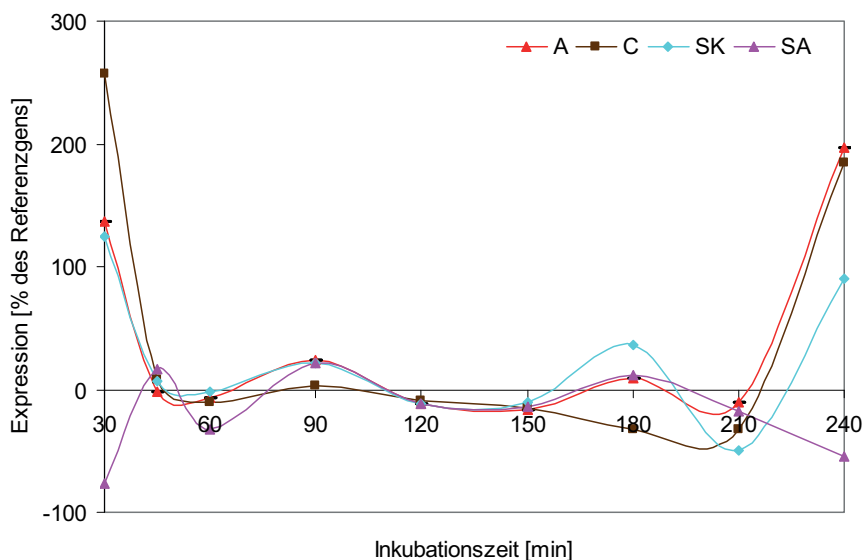


Abb.6.2 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von IPP in Fibroblasten als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

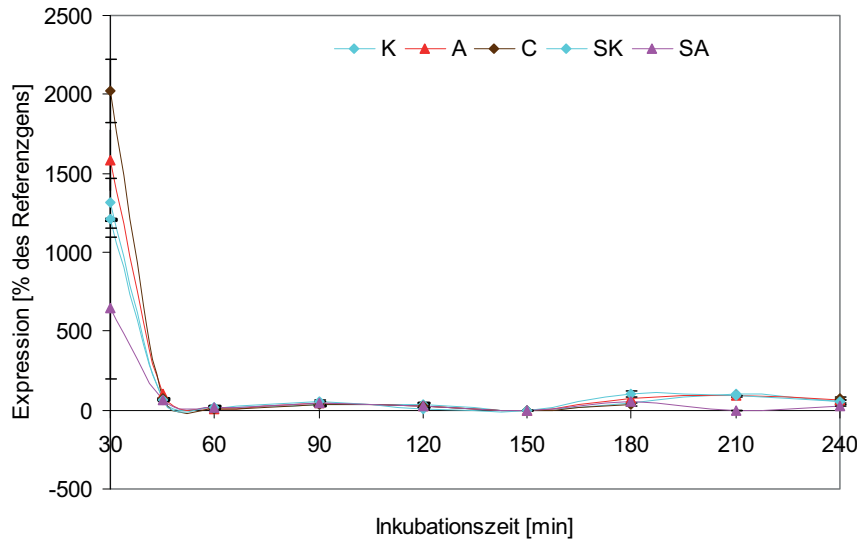


Abb.6.3 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von LIS in Fibroblasten. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

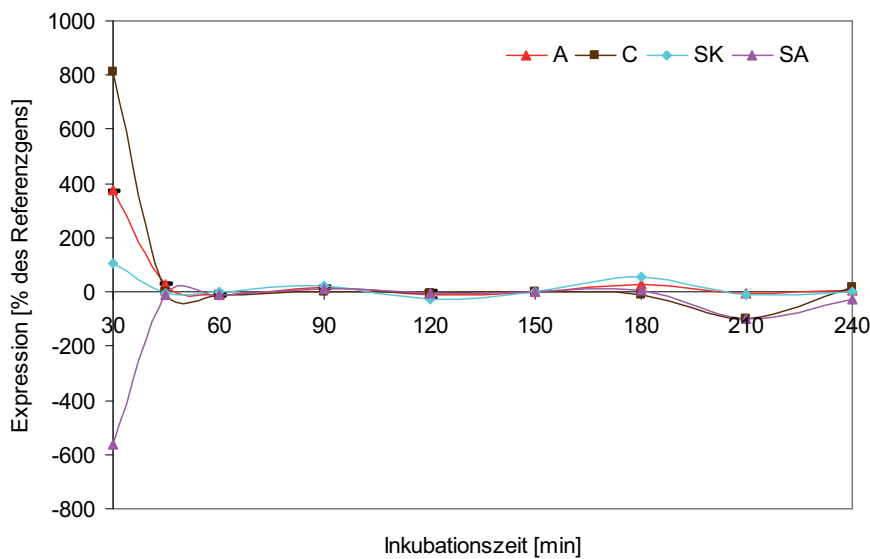


Abb.6.4 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von LIS in Fibroblasten als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

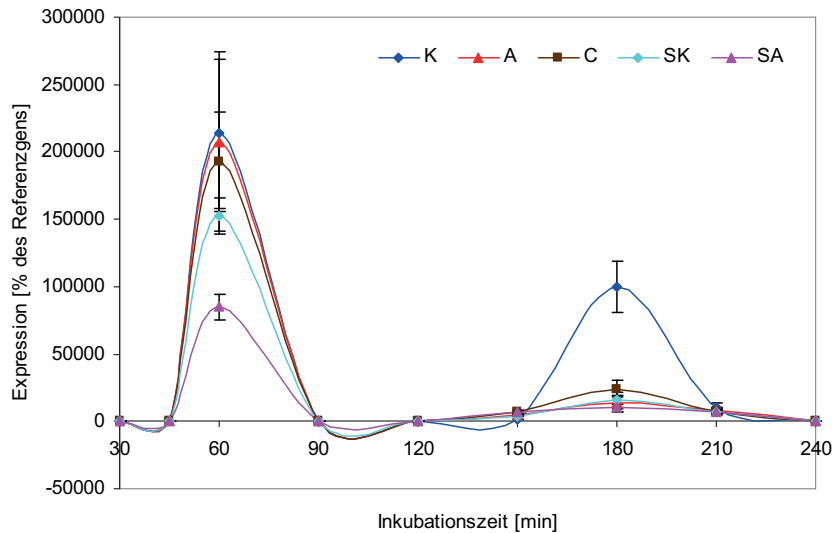


Abb.6.5 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von GAPDH in HL-1 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

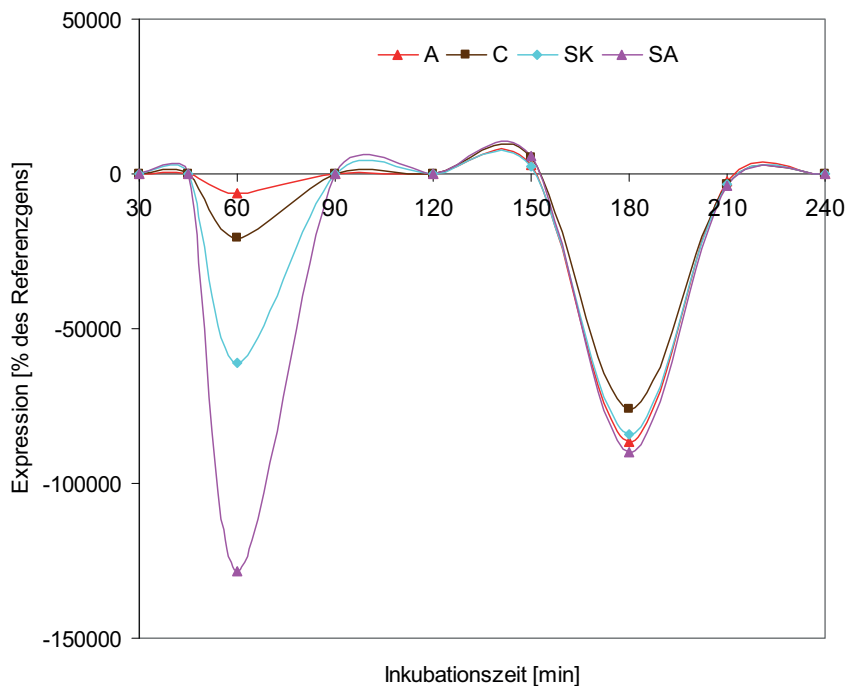


Abb.6.6 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von GAPDH in HL-1 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

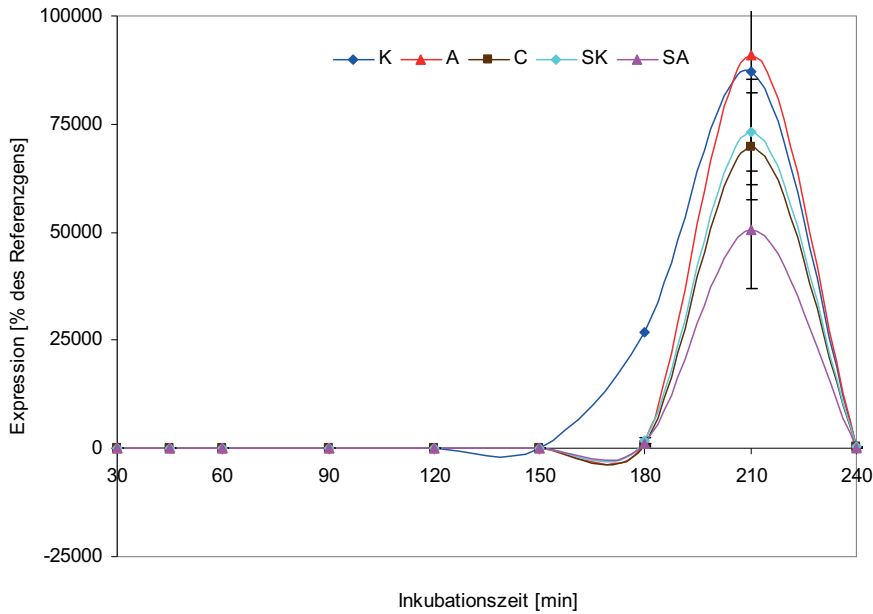


Abb.6.7 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von Beta-Aktin in HL-1 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

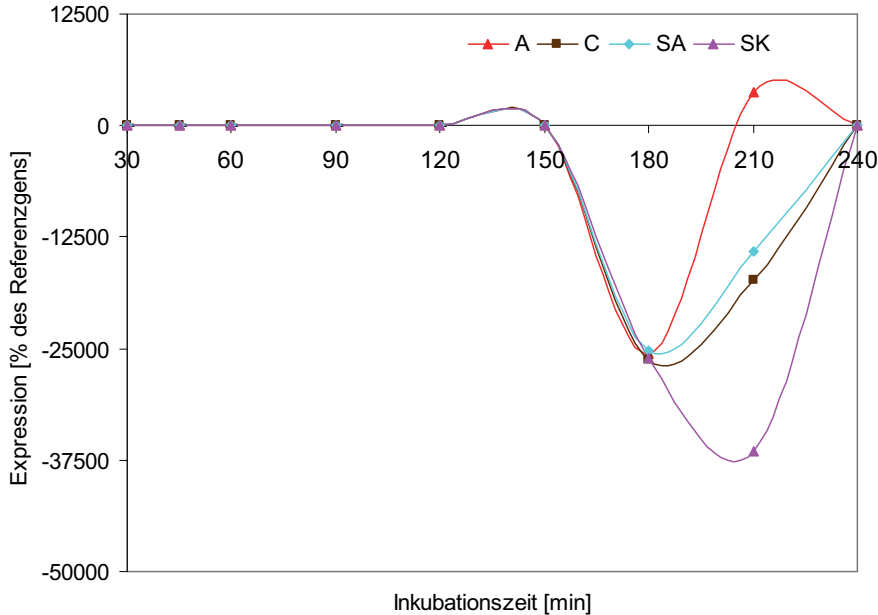


Abb.6.8 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von Beta-Aktin in HL-1 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

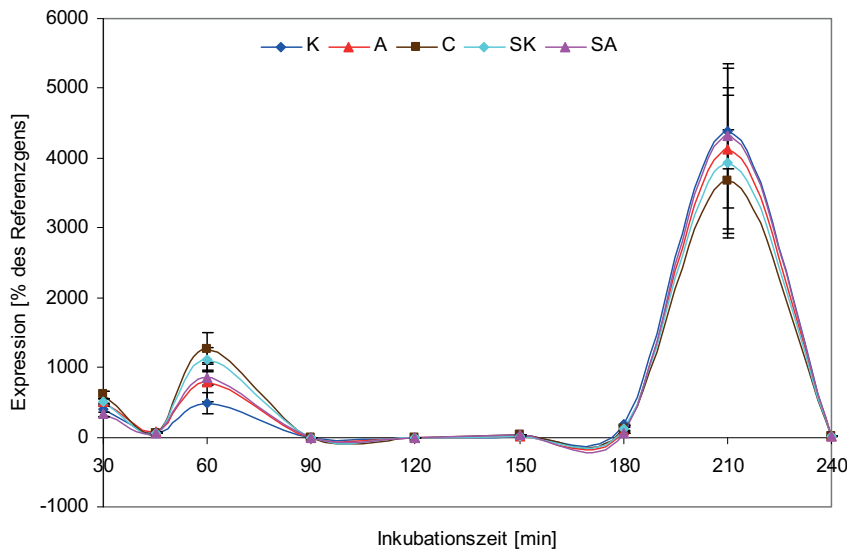


Abb.6.9 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von IPP in HL-1 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

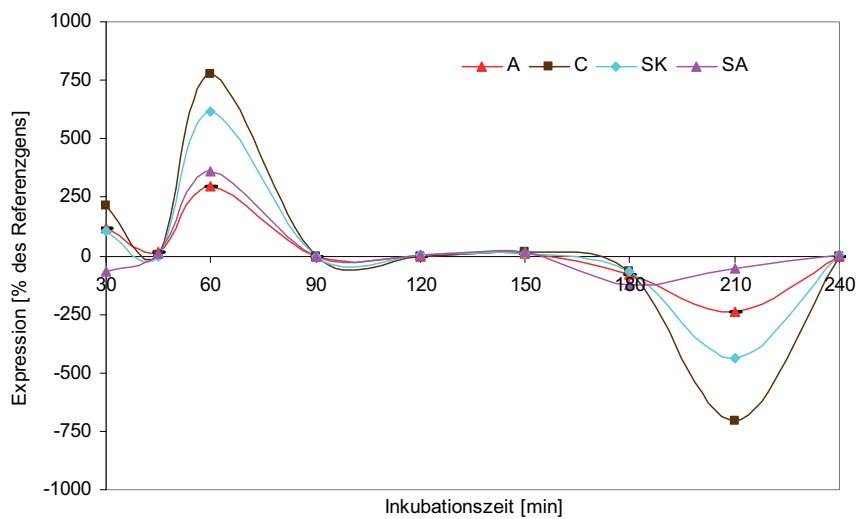


Abb.6.10 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von IPP in HL-1 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

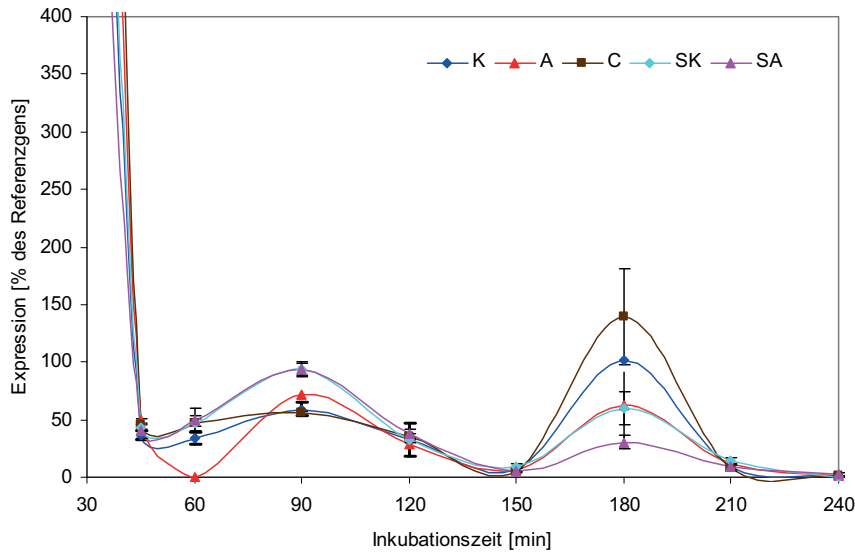


Abb.6.11 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von LIS in HL-1 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

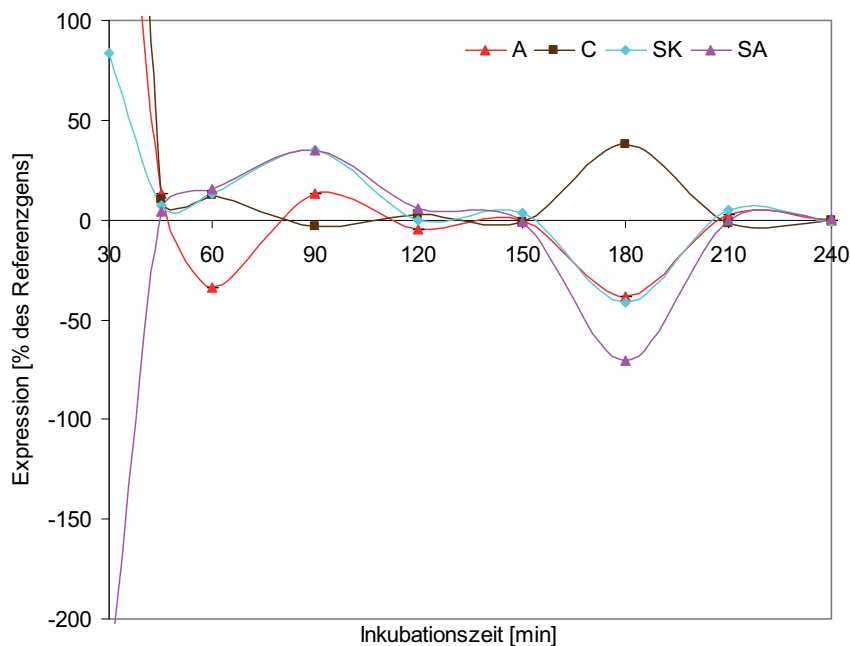


Abb.6.12 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von LIS in HL-1 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

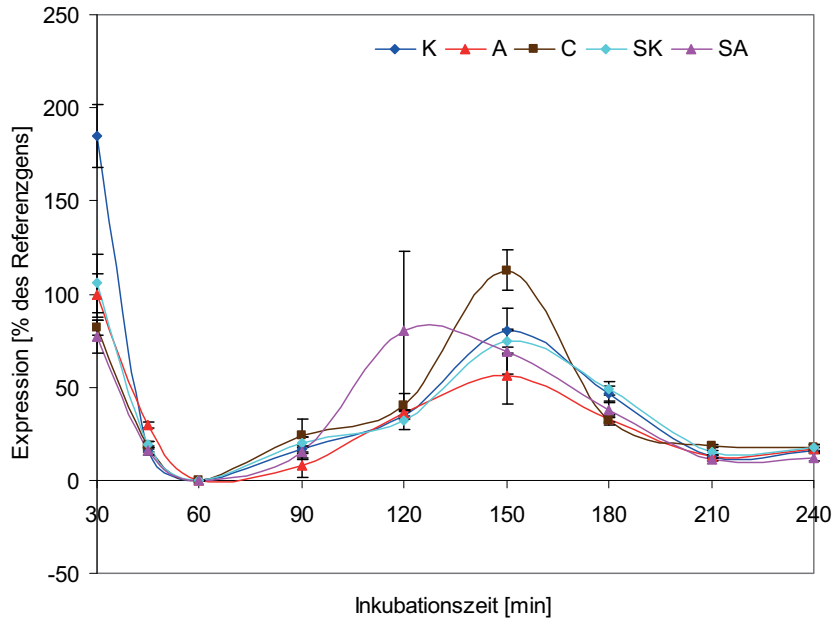


Abb.6.13 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von FKBP in HL-1 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

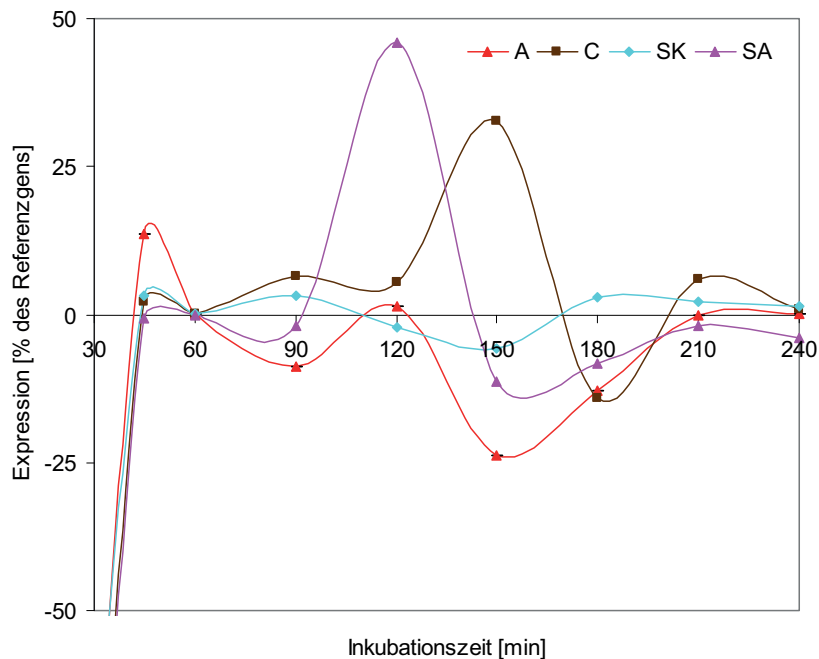


Abb.6.14 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von FKBP in HL-1 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

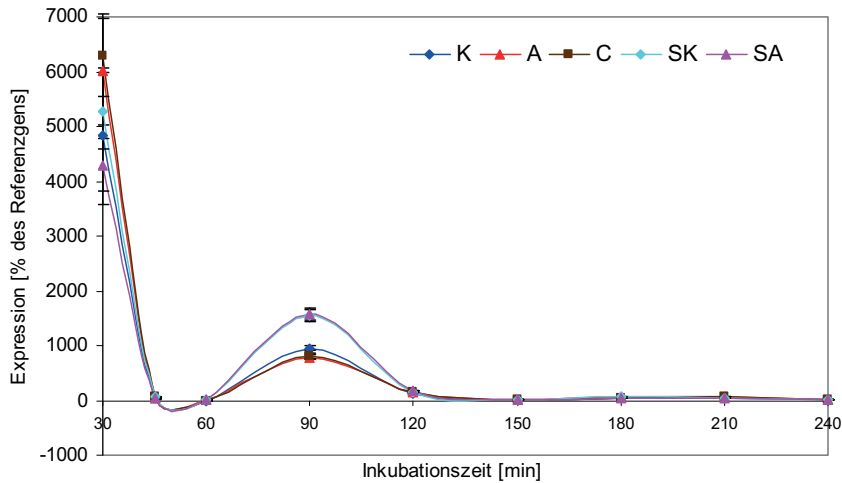


Abb.6.15 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von PPIase in HL-1 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

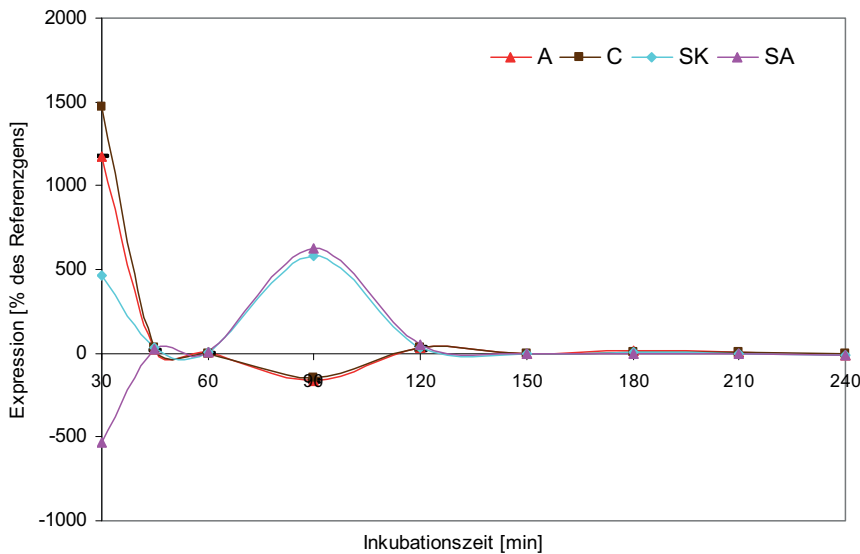


Abb.6.16 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von PPIase in HL-1 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

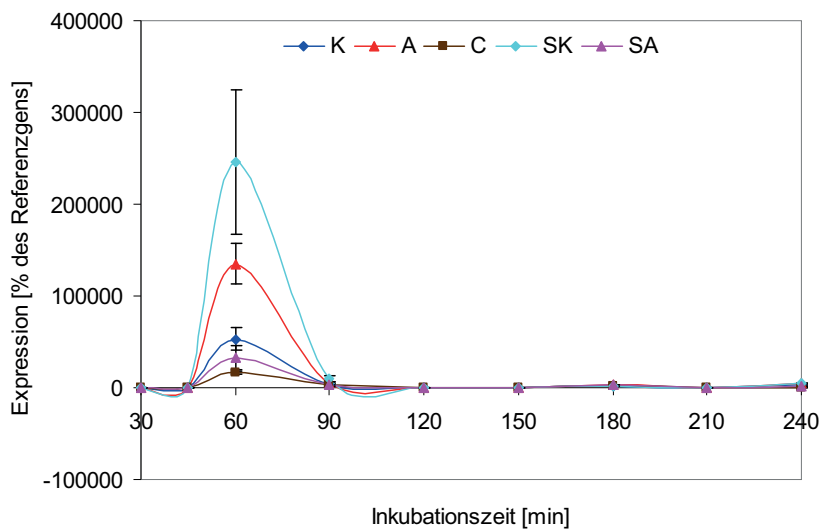


Abb.6.17 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von GAPDH in HCT 116 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

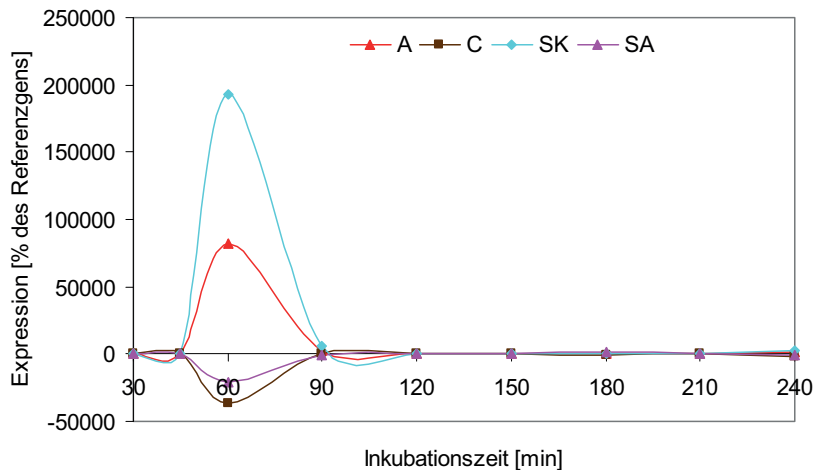


Abb.6.18 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von GAPDH in HCT 116 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

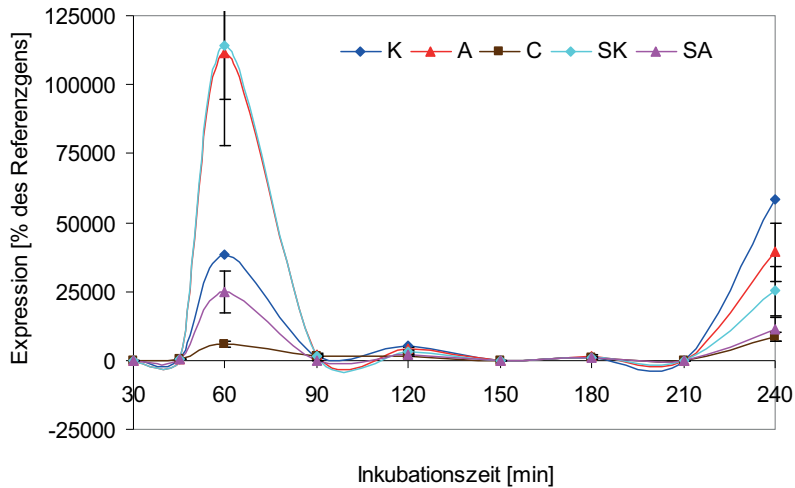


Abb.6.19 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von Beta-Aktin in HCT 116 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

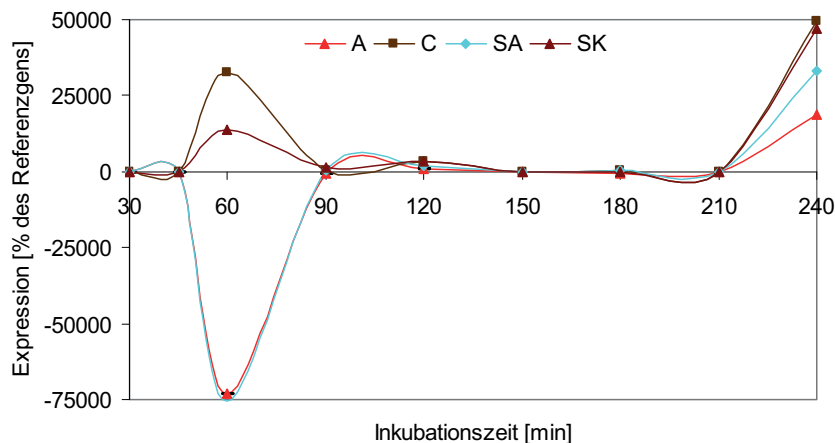


Abb.6.20 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von Beta-Aktin in HCT 116 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

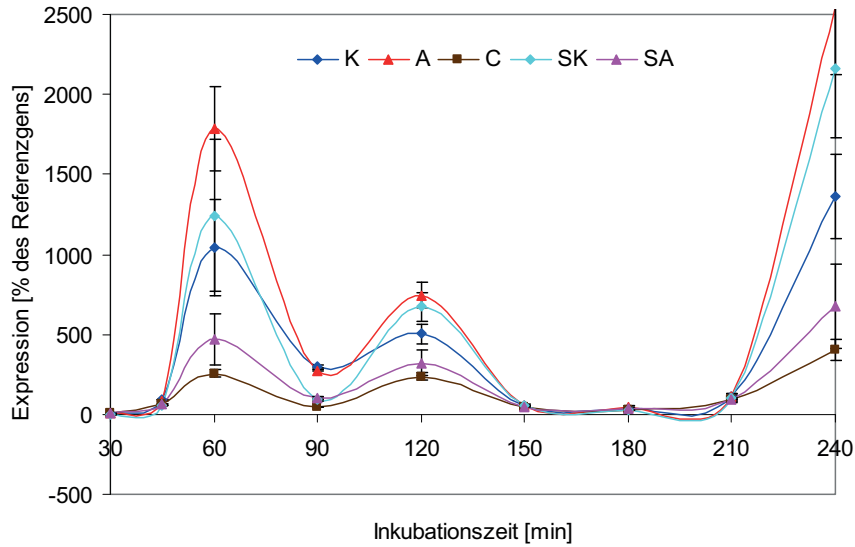


Abb.6.21 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von IPP in HCT 116 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

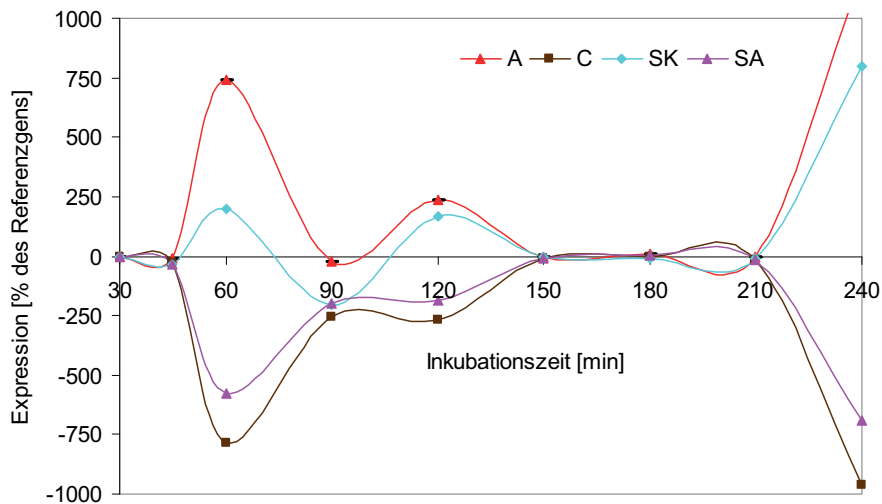


Abb.6.22 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von IPP in HCT 116 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

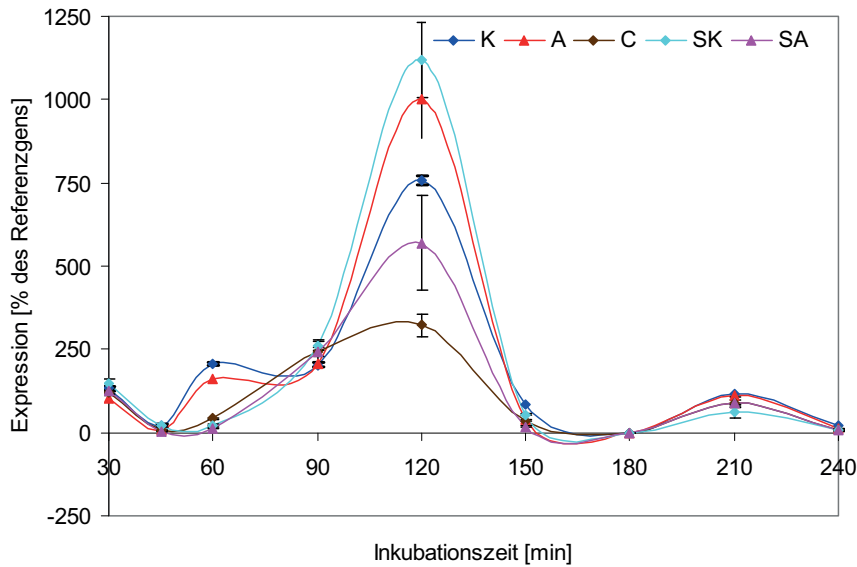


Abb.6.23 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von LIS in HCT 116 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

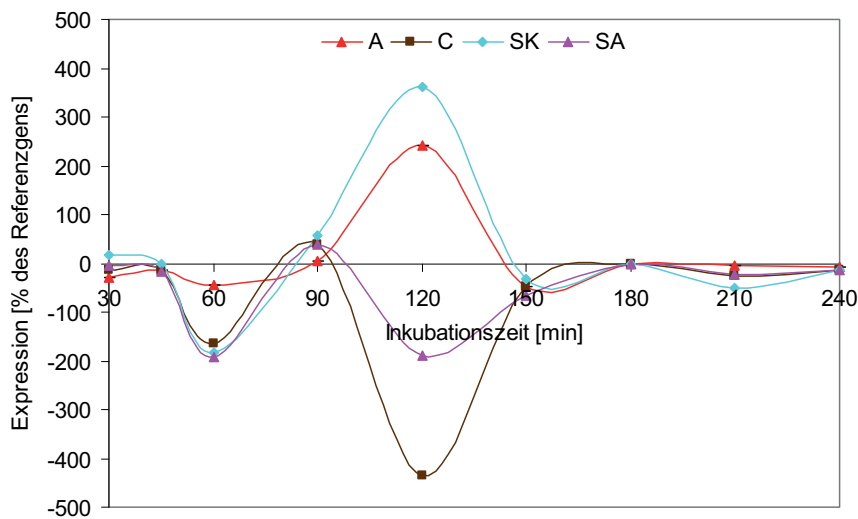


Abb.6.24 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von LIS in HCT 116 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

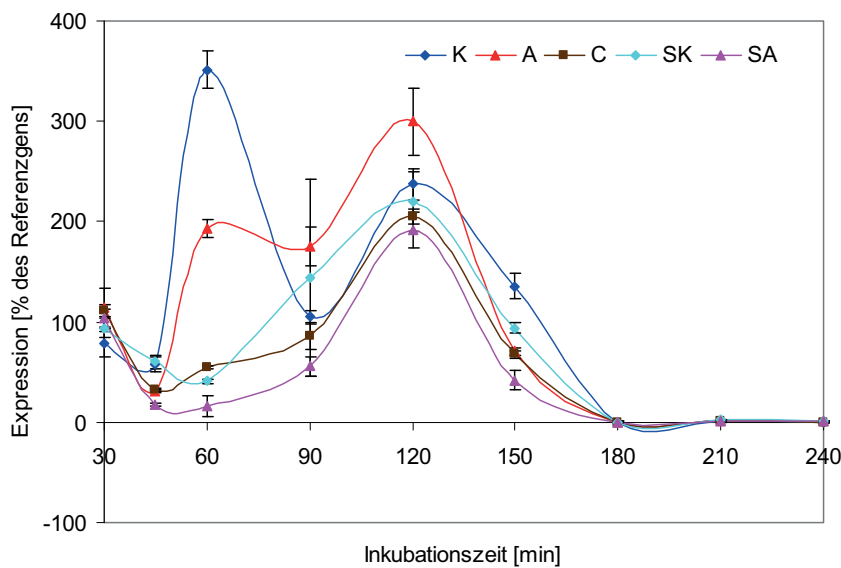


Abb.6.25 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von FKBP in HCT 116 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

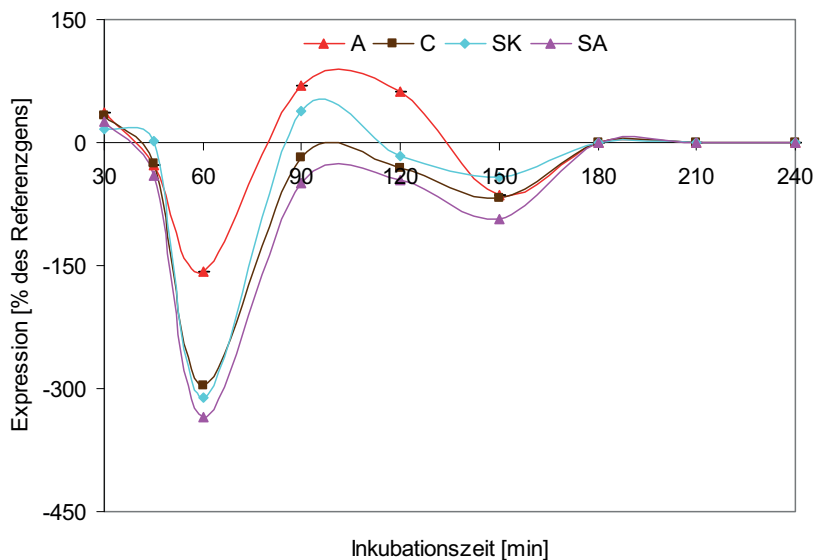


Abb.6.26 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von FKBP in HCT 116 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

6. ANHANG

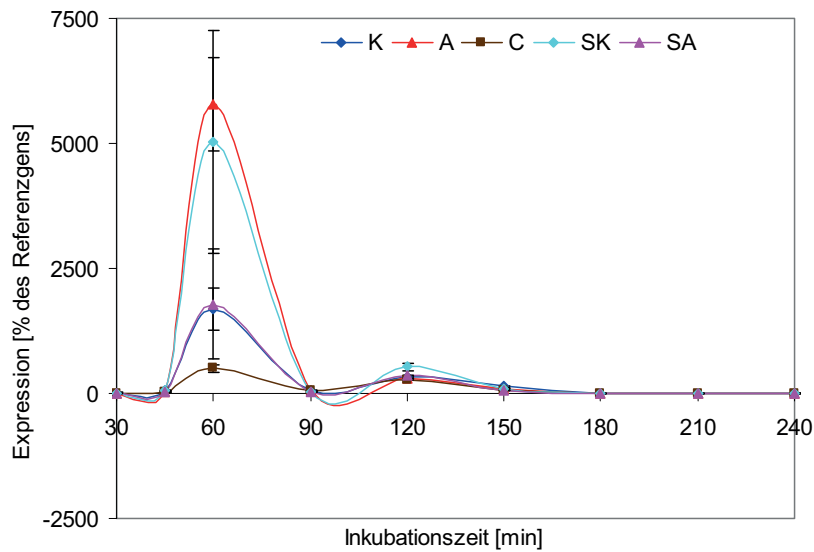


Abb.6.27 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von PPIase in HCT 116 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Proben aus den RT-PCR Experimenten, dabei wurden die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK)

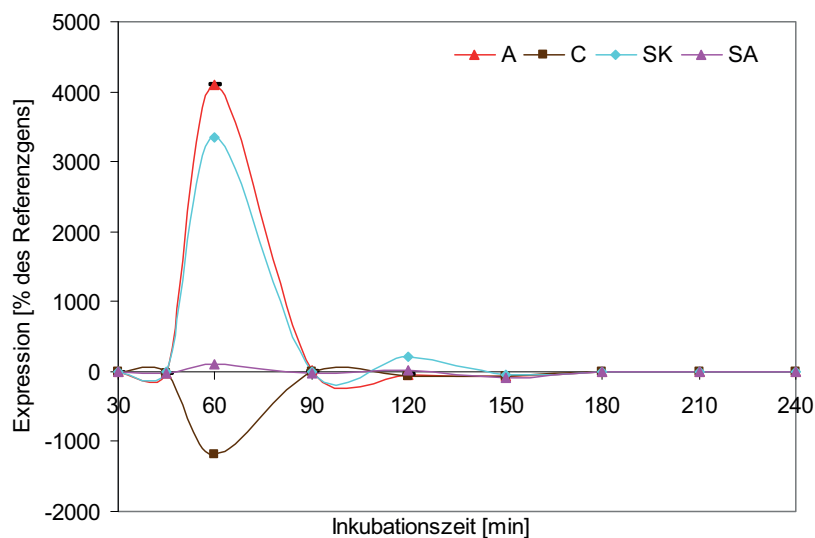


Abb.6.28 Der virtuelle Zeitverlauf der Expression von PPIase in HCT 116 Zellen als Differenz zur Kontrolle. Dargestellt sind die Differenzen der Mittelwerte der Proben zu den Mittelwerten der Kontrolle, die Standardabweichungen wurden vernachlässigt, die Punkte interpoliert. Die Inkubation erfolgte mit 10 nM Aldosteron (A), Corticosteron (C) oder dem gleichen Volumen Ethanol zur Kontrolle (K), bzw. nach 30-minütiger Präinkubation (10 μ M Spironolacton) mit 10 nM Aldosteron (SA) oder dem gleichen Volumen Ethanol (SK).

Veröffentlichungen

- Böhmer, S.; Carapito, C.; Wilzewski, B.; Leize, E.; Van Dorsselaer, A.; Bernhardt, R.,
Analysis of aldosterone-induced differential receptor-independent protein patterns
using 2D-electrophoresis and mass spectrometry. *Biol Chem* 2006, 387 (7), 917-929.
- Monostory, K.; Pascussi, J. M.; Szabo, P.; Temesvari, M.; Kohalmy, K.; Acimovic, J.; Kocjan,
D.; Kuzman, D.; Wilzewski, B.; Bernhardt, R.; Kobori, L.; Rozman, D., Drug
Interaction Potential of 2-((3,4-Dichlorophenethyl)(propyl)amino)-1-(pyridin-3-
yl)ethanol (LK-935), the Novel Nonstatin-Type Cholesterol-Lowering Agent. *Drug
Metab Dispos* 2009, 37 (2), 375-385.
- Zöllner, S.; Hwang, K. H.; Wilzewski, B.; Carapito, C.; Leize-Wagner, E.; Van Dorsselaer, A.;
Bernhardt, R., Aldosterone: From biosynthesis to non-genomic action onto the
proteome. *Steroids* 2008, 73 (9-10), 966-972.

In Vorbereitung

- Wilzewski, B. , Zöllner, S., Bernhardt, R.
Validation of non MR mediated effects of aldosterone in mammalian cell culture
- Wilzewski, B., Bernhart, R.
Dynamic expression patterns after aldosterone treatment in mammalian cell culture

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt für die Bereitstellung dieses spannenden, komplexen (und oft nervenaufreibenden) Themas und für die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken. Danke für das in mich gesetzte Vertrauen und für die Gelegenheit, Menschen aus so vielen verschiedenen Kulturen kennen zu lernen und für eine Arbeitsatmosphäre, in der sich Wissenschaft, Pragmatismus, Pilze sammeln und Fußballwetten so mühelos integrieren – danke für die schönen Jahre!

Mein Dank gilt Dr. Heiko Kilter für die Diskussion geeigneter Zelllinien und die Versorgung mit primären Fibroblasten.

Ich danke Frau Prof. Dr. Petra Bauer für ihre Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten (obwohl ich vorher nicht gesagt hatte, wie lang sie geworden ist – ich hoffe, Sie sind noch guten Mutes hier hinten angekommen).

Ein herzliches Dankeschön allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, ich habe gerne mit euch gearbeitet! Aus vielen Kollegen sind Freunde geworden, ihr hattet entscheidenden Anteil daran, dass ich im Institut mehr als nur ein wenig zuhause war...

Besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. Frank Hannemann danken - für viele gute und ehrliche Ratschläge, für das Korrekturlesen dieser Arbeit und seiner unerschöpflichen Hilfsbereitschaft bei den Druckkatastrophen. Und für seine Bereitschaft, das Universum im Allgemeinen und Besonderen mit mir zu diskutieren. Vor allem unsere Pflanzenzuchtversuche werden mir immer in guter Erinnerung bleiben.

Mein großer Dank gilt meinen „Raumteilern“: Susanne für Hektoliter ostfriesischen Tees, offene Ohren und für' s Ruhe bewahren, wenn es bei mir mal hektisch wurde. Silvia, für die Erweiterung meines italienischen Wort- und Kochschatzes und dafür, dass alles grundsätzlich immer kein Problem ist! Und Martin, weil er für jede Lebenslage die richtige Musik zur Hand hatte, mit mir gelacht und mit viel Geduld ertragen hat, wenn ich weinen musste. Ihr seid großartig und ich bin froh, mit euch befreundet zu sein!

Ich danke Berna, dass sie mich während des Schreibens betütelt („komm, schreib noch ein bisschen“) und mit Börek versorgt hat und immer bereit war, mit mir ernsthaft zu diskutieren – auch über meine Lieblingsserie.

Herzlichen Dank an Anja, die meine Diskrepanzen mit Sigma Plot stets prompt geschlichtet hat und mir in Layoutfragen via Skype beratend zur Seite stand.

Ich danke Wanda für all die motivierenden E-mails und den regen Erfahrungsaustausch über die Höhen & Tiefen des Schreibens.

Was wäre das Leben ohne die Phasen der Entspannung, in denen man Kraft schöpft? Herzlichen Dank für Espressopausen, Feierabendbiere, Filmabende, für Koch- und Backaktionen: Andy, Anja, Anna, Berna, Burkhard, Daniela, Elisa, Frank, Heike, Hektor, Jens, Kerstin, Michael, Rajita, Sabrina, Simon, Spela (für den weltbesten Milchschaum!), Thoa, Thuy, Wanda & Yogan!

Besonderer Dank gilt Ditmar, der mich während der Fleißarbeiten regelmäßig am Riemen gerissen hat, danke für die Motivation, die täglichen Anrufe und die Organisation eines Arbeitsplans, der mir noch Zeit für angenehme Dinge gelassen hat.

Der größte Dank gilt meinen Freunden und meiner ganzen Familie, für moralische, seelische und finanzielle Unterstützung: ganz besonders Eli und Hans, ihr habt für mich den gleichen Stellenwert wie umgekehrt – unersetzlich.