

Aus dem
Charité Centrum für Therapieforschung (CC 4)
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz

Habilitationsschrift

Die Bedeutung post-transkriptioneller Regulationsmechanismen der Genexpression in experimentellen kardiovaskulären und renalen Systemen

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
"Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie"

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Andreas Eisenreich

Eingereicht: November 2016

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Walter Raasch, Lübeck

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas Zirlik, Freiburg

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1. Der Einfluss der Regulation der Geneexpression auf die Steuerung biologischer Funktionen.....	4
1.2. Alternatives Spleißen und dessen (patho-)physiologische Bedeutung	5
1.3. Post-transkriptionelle Steuerung der Genexpression durch miRNAs	8
1.4. Die Bedeutung der Proteinexpression für kardiovaskuläre und renale Funktionen.....	10
1.5. Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulären und renalen Funktionen unter (patho-)physiologischen Bedingungen	12
2. Fragestellung	14
3. Eigene Arbeiten	15
3.1. Der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg beeinflusst das alternative Spleißen von TF in Endothelzellen	15
3.2. Im kardiovaskulären System wirkt asTF als ein pro-angiogener Faktor.....	24
3.3. SR-Proteinkinasen beeinflussen das alternative Spleißen von Cyr61 und von Itg- α v in Endothelzellen	34
3.4. Die Expression beider TF-Isoformen wird durch miR-126 und miR-19a auf post-transkriptioneller Ebene beeinflusst	44
3.5. MiR-29b reguliert auf post-transkriptioneller Ebene die Expression von PDPN, welches das Zellüberleben von Podozyten beeinflusst	52
4 Diskussion	63
4.1 Die Steuerung und Bedeutung alternativer Spleißprozesse im kardiovaskulären System	63
4.1.1 SR-Proteine und deren Kinasen spielen eine wichtige Rolle für die Steuerung des alternative Spleißens von TF	63
4.1.2 AsTF wirkt im kardiovaskulären System pro-angiogen und proliferationssteigernd	66
4.1.3 Das alternative Spleißen von Cyr61 und Itg- α v β 3 beeinflusst die regenerativen Eigenschaften von Endothelzellen	70
4.2 Der Einfluss miRNA-vermittelter post-transkriptioneller Regulationsmechanismen der Genexpression im kardiovaskulären und renalen System	73

4.2.1 Die endotheliale Thrombogenität wird durch die miRNA- vermittelte Kontrolle der TF-Isoformexpression moduliert	74
4.2.2 Die funktionelle Bedeutung der miRNA-vermittelten Regulation von PDPN in Podozyten	76
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis	85
7. Danksagung	93
8. Erklärung	94

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3'-untranslatierte Region
Ang	Angiotensin
as	alternativ gespleißt
ASF/SF2	Alternativer Spleißfaktor/Spleißfaktor 2
CKD	chronische Nierenerkrankung (<i>chronic kidney disease</i>)
Clk	Cdc2- <i>like</i> Kinase
Cyr61	<i>cysteine-rich 61</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
ESE	<i>exonic splice enhancer</i>
fl	<i>full-length</i>
ISE	<i>intronic splice enhancer</i>
ISS	<i>intronic splice silencer</i>
Itg	Integrin
miRNA	mikro Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MWF	Munich Wistar Frömter
NFkB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
p38	p38-mitogenaktivierten Proteinkinase
PDPN	Podoplanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB/Akt	Proteinkinase B
r	rekombinant
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
si	<i>small interfering</i>
SR	Serin/Arginin-reich
TF	<i>Tissue Factor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Top1	DNA-Topoisomerase I
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

1. Einleitung

1.1. Der Einfluss der Regulation der Geneexpression auf die Steuerung biologischer Funktionen

Die Bildung von Proteinen als Resultat der Genexpression sowie die Regulation bzw. Modifikation von Proteinexpressionsmustern in Anpassung an sich ändernde Bedingungen, spielen eine entscheidende Rolle für die Steuerung aller biologischen Funktionen in lebenden Organismen (Abbildung 1) [1-3]. Die Proteinexpression wird sowohl auf transkriptioneller, als auch auf post-transkriptioneller Ebene gesteuert [1, 4]. Das humane Genom beinhaltet ca. 24.000 proteinkodierende Gene [5]. Die bloße Transkription dieser Gene würde die Zahl an möglichen Proteinprodukten stark limitieren [6]. Man schätzt aber die Zahl an Proteinen, die im menschlichen Organismus gebildet werden und biologische Prozesse beeinflussen, auf mehr als 100.000 [6]. Daraus leitete sich ab, dass neben der Transkriptionssteuerung zusätzliche post-transkriptionelle Mechanismen existieren müssen, welche die Zahl an tatsächlich entstehenden Proteinprodukten erhöhen [7]. Zwei der bedeutendsten Mechanismen, welche die post-transkriptionellen Regulation der Genexpression und die damit einhergehenden Expansion der Menge an funktionellen Proteinprodukten steuern, sind alternatives Spleißen und mikro (mi) Ribonukleinsäure (RNA)-vermittelte Kontrollmechanismen [4, 6-8].

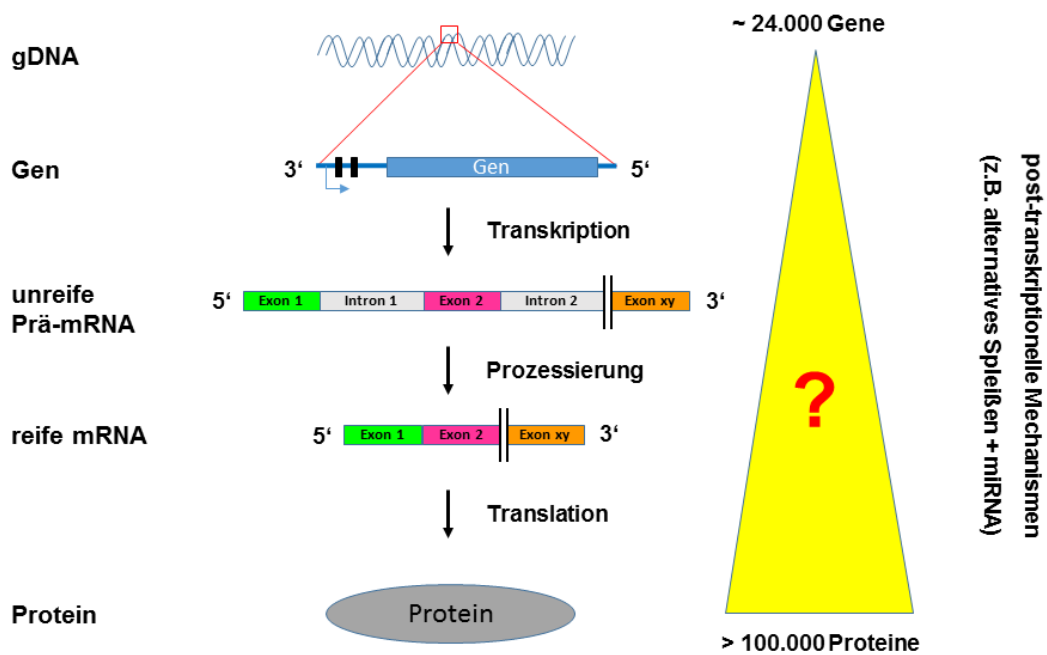


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Genexpression. Die Transkription von Genen, welche in der genomischen (g) Desoxyribonukleinsäure (DNA) kodiert vorliegen, führt zur Bildung unreifer Primärtranskripte (Prä-messenger RNA; Prä-mRNA). Durch nachfolgende Prozessierungsschritte wird daraus eine reife mRNA gebildet, die zu einem funktionellen Protein translatiert wird. Man nimmt an, dass etwa 24.000 proteinkodierende Gene im humanen Genom kodiert sind, aber mehr als 100.000 Proteine daraus entstehen [5, 6]. Diese Vervielfachung der Zahl an funktionellen Proteinen wird u.a. durch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen der Genexpression, wie alternatives Spleißen und mikroRNA (miRNA)-vermittelte Prozesse, erreicht [6-8].

1.2. Alternatives Spleißen und dessen (patho-)physiologische Bedeutung

Die Transkription eines Gens führt zur Bildung eines primären Transkriptes, der sogenannten Prä-messenger RNA (Prä-mRNA) [2]. Mehr als zwei Drittel dieser menschlichen Primärtranskripte unterliegen alternativen Spleißprozessen, was zur Bildung verschiedener mRNA-Spleißvarianten führt [8, 9]. Diese können dann zu Proteinisoformen translatiert werden, die sich in Ihrer Aktivität, Substrataffinität und Lokalisation unterscheiden können [8]. Alternative Spleißprozesse können durch sich ändernde Einflüsse, wie eine verringerte Sauerstoffversorgung, oder stimulatorische Reize, wie pro-inflammatorische Zytokine, beeinflusst werden [8,

10-13]. Dies wiederum kann zu Veränderungen der Expression von Proteinisoformen und damit auch von isoformvermittelten biologischen Funktionen führen [8, 10, 12]. Auf diese Weise trägt das alternative Spleißen maßgeblich zur funktionellen Diversifizierung und Anpassungsfähigkeit des Proteoms an sich ändernde Bedingungen bei [4, 8].

An der Regulation des Spleißens von Prä-mRNAs im Zellkern (Abbildung 2) sind verschiedene Faktoren, wie Enzyme, Enzymkomplexe und andere Proteine, beteiligt [8, 9]. Eine besondere Bedeutung für die Steuerung des alternativen aber auch des konstitutiven Spleißens besitzen die sogenannten Serin/Arginin-reichen (SR)-Proteine [2, 9]. Über Ihre Bindung an regulatorische Sequenzabschnitte innerhalb der Prä-mRNA markieren diese Faktoren sogenannte Spleißorte [9, 14, 15]. Dies führt dazu, dass intronische oder exonische Abschnitte der Prä-mRNA durch das Spleißosom herausgespleißt werden oder in der reifen mRNA verbleiben [9]. Als Ergebnis dieser Prozessierungsschritte entstehen unterschiedliche mRNA-Spleißvarianten [9, 14, 15]. Die Lokalisation von SR-Proteinen sowie deren Aktivität und Affinität zu ihren spezifischen Bindesequenzen innerhalb einer Ziel-Prä-mRNA werden über ihre Phosphorylierungszustände gesteuert [2, 9]. Die Phosphorylierung von SR-Proteinen wird durch sogenannte SR-Proteinkinasen, wie die Familie der Cdc2-like Kinasen (Clk), die Proteinkinase B (PKB/Akt) oder die DNA-Topoisomerase I (Top1), vermittelt [2, 9, 16]. Ihre Dephosphorylierung wird durch Proteinphosphatasen, wie Proteinphosphatase 1 gesteuert [9].

Unter physiologischen Bedingungen haben Veränderungen alternativer Spleißprozesse und davon abhängige Modifikationen des Expressionsmusters verschiedener Proteinisoformen, wie zum Beispiel der Isoformen des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) oder von *Tissue Factor* (TF), großen Einfluss auf biologische Prozesse, wie die Gefäßpermeabilität oder die Blutgerinnung [4, 10, 11, 17]. Diese Prozesse spielen sowohl im kardiovaskulären System als auch in der Niere eine bedeutende Rolle [9, 17]. Daher haben Veränderungen der oben genannten Faktoren und Prozesse auch großen Einfluss auf die Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen, wie der dilatativen Kardiomyopathie, dem Myokardinfarkt und der chronischen Nierenerkrankung („*chronic kidney disease*“, CKD [9, 17, 18].

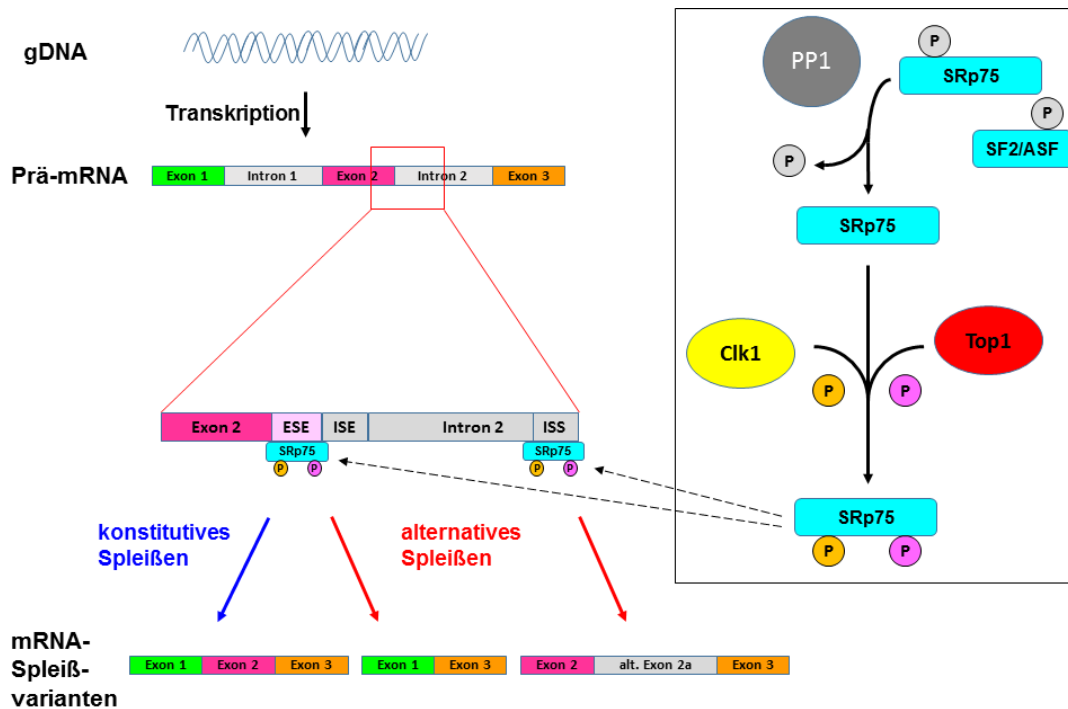


Abbildung 2. Steuerung von Spleißprozessen im Zellkern. Für die Kontrolle des konstitutiven und des alternativen Spleißens spielen SR-Proteine, wie SR-Protein 75 (SRp75) oder Alternativer Spleißfaktor/Spleißfaktor 2 (ASF/SF2), eine besonders wichtige Rolle. Ihre Lokalisierung, Affinität zu regulatorischen Bindemotiven und Aktivität beim Spleißen wird über Ihre Phosphorylierungszustände gesteuert. SR-Proteine werden über SR-Proteinkinasen, wie die *Cdc2-like Kinase 1* (Clk1) oder die DNA-Topoisomerase 1 (Top1), phosphoryliert (P). Die Dephosphorylierung wird u.a. durch Proteinphosphatase 1 vermittelt. Die Transkription eines Gens, welches in der Erbinformation kodiert ist (genomische DNA, gDNA), führt zur Bildung eines Primärtranskriptes (Prä-mRNA). Diese Prä-mRNA besteht aus exonischen (Exon 1-3) und intronischen (Intron 1-2) Bereichen. Innerhalb dieser Exons und Introns liegen regulatorische Sequenzen, welche durch Anbindung von SR-Proteinen das Spleißen fördern (*intrinsic splice enhancer*, ISE; *exonic splice enhancer*, ESE) bzw. hemmen (z.B. *intrinsic splice silencer*, ISS). Binden nun Spleißfaktoren, wie phosphoryliertes SRp75, an diese regulatorischen Prä-mRNA-Bindemotive (z.B. ISS, ESE) beeinflusst dies direkt die Wahl von Spleißorten durch das Spleißosom. Dies führt beim konstitutiven Spleißen zum Herausschneiden aller Introns und Zusammenführen der Exons. Bei der Beeinflussung des alternativen Spleißens kann es u.a. zum Herausspleißen exonischer Sequenzen kommen. Ferner kann das Herausschneiden intronischer Abschnitte auch gehemmt werden, so dass diese in der reifen mRNA belassen werden und sogenannte alternative (alt.) Exons entstehen. Ausgehend von einer Prä-mRNA entstehen so verschiedene, reife mRNA-Spleißvarianten, die potentiell zu Proteinisofomen mit unterschiedlicher Funktion, Affinität oder Lokalisierung translatiert werden.

1.3. Post-transkriptionelle Steuerung der Genexpression durch miRNAs

Neben alternativen Spleißprozessen spielen mikroRNAs (miRNAs) eine wichtige Rolle bei der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression [19]. Man schätzt den Anteil an humanen Gentranskripten, die über miRNA-vermittelte Mechanismen beeinflusst werden, auf etwa 30% bis 60% [20, 21]. Dabei kann eine miRNA die Expression von hunderten unterschiedlicher Gene bestimmen [19]. Über die Modifikation der Proteinexpression werden so auch die Funktionen von Zellen und Geweben gesteuert [22, 23].

MiRNA sind einzelsträngige nicht-proteinkodierende RNAs mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden [24]. Die Transkription miRNA-kodierender Gene mittels RNA-Polymerase II (RNA-Pol II) führt zur Expression sogenannter primärer miRNAs (Pri-miRNAs) (Abbildung 3), welche eine typische Haarnadelstruktur aufweisen [23, 25]. Im Zellkern werden diese Pri-miRNAs weiter prozessiert, woran u.a. die RNase III (Drosha) sowie ein weiterer Ko-Faktor (*Di George syndrome critical region gene 8*); beteiligt sind. Dies führt zur Bildung sogenannter Prä-miRNAs. Diese unreifen miRNA-Vorläufermoleküle werden mittels Exportin 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma werden sie weiter prozessiert, worin u.a. eine weitere RNase III (Dicer) und das TAR RNA-binde-Protein involviert sind. Auf diese Weise wird eine ca. 22 Nukleotide lange miRNA-Duplexstruktur gebildet. An diese bindet nachfolgend ein Mitglied der Argonaut (Ago)-Proteinfamilie, was den Einbau des miRNA-Duplex in den sogenannten *RNA induced silencing complex* (RISC) vermittelt. Innerhalb dieser miRNA-Duplex/RISC-Struktur wird einer der beiden Einzelstränge fest integriert, während der andere Strang (meist der miRNA* oder „guide“-Strang) abgebaut wird. Die im RISC gebundene miRNA kann nun an ihre korrespondierende Zielsequenz innerhalb der regulatorischen 3'-untranslatierten Region (3'UTR) einer bestimmten Ziel-mRNA binden. Dies führt abschließend zur mRNA-Spaltung (nur bei perfekter, komplementärer Basenpaarung) bzw. zur Hemmung der Translation oder mRNA-Destabilisierung (bei nicht-perfekter Basenkomplementarität) [23, 25].

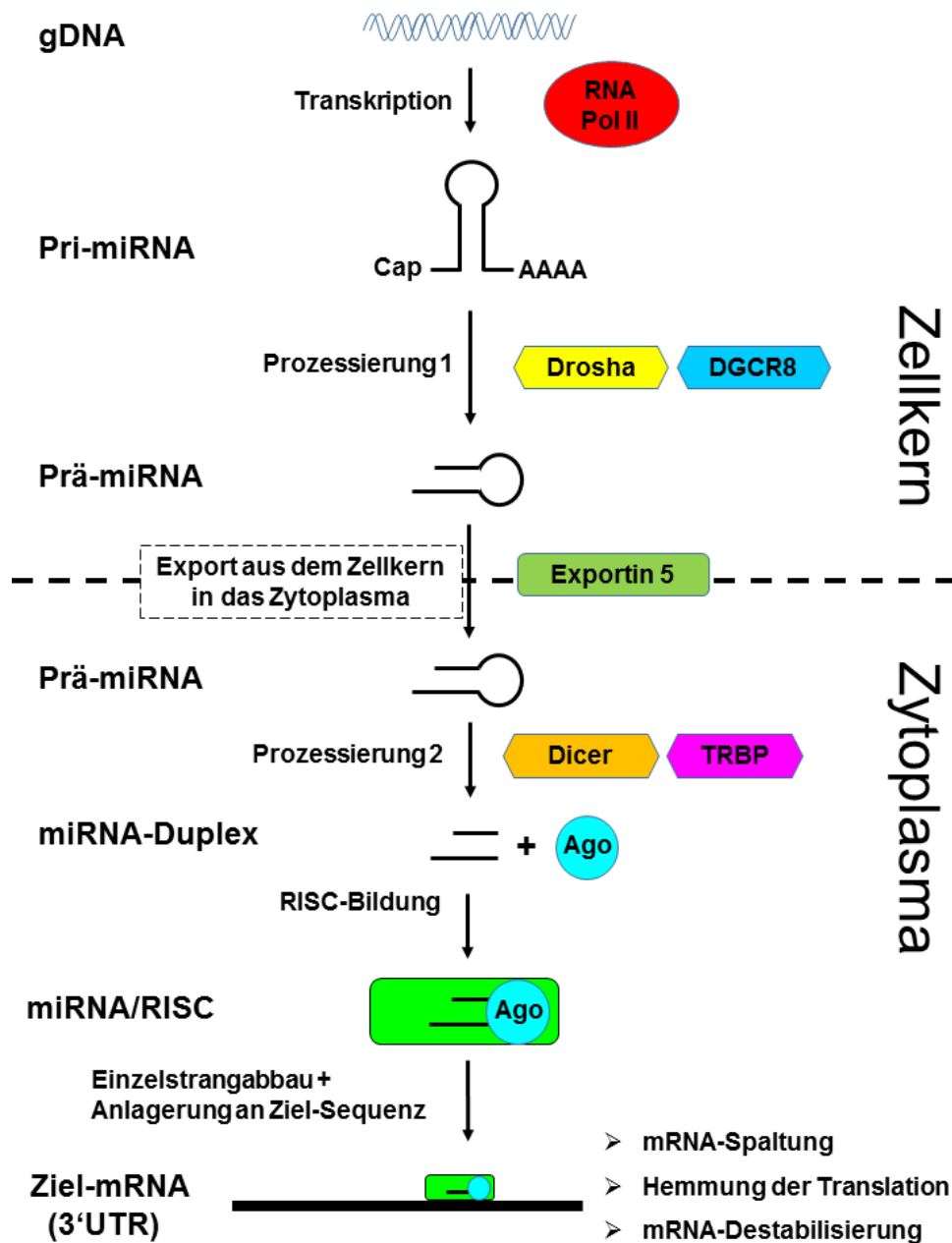


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Bildung und Funktion von miRNAs. Abgebildet ist die Biogenese von miRNAs. Im Zellkern führt die RNA-Polymerase II (RNA-Pol II)-vermittelte Transkription von miRNA-Sequenzen, welche in der genomischen (g)DNA kodiert sind, zur Bildung einer primären miRNA (Pri-miRNA). Diese wird unter Beteiligung einer RNase III (Drosha) und DGCR8 (*Di George syndrome critical region gene 8*) zu einer unreifen Prä-miRNA-Form prozessiert und durch Exportin 5 in das Zytoplasma exportiert. Mittels einer weiteren RNase III (Dicer) und TAR RNA-binde-Protein (TRBP) wird eine miRNA-Duplexstruktur gebildet, welche durch ein Argonaut-Protein (Ago) gebunden und in den *RNA induced silencing complex* (RISC) inkorporiert wird. Dort wird ein Einzelstrang degradiert und der andere miRNA-Strang wird in den RISC integriert (miRNA/RISC). Die miRNA leitet so den RISC zur einer Zielsequenz innerhalb der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der entsprechenden Ziel-mRNA. Dies führt schließlich zur mRNA-Spaltung (bei perfekter Basenkomplementarität) bzw. zur Hemmung der Translation oder mRNA-Destabilisierung (bei nicht-perfekter Basenkomplementarität).

Veränderungen von Expressionsmustern einzelner oder mehrerer miRNAs spielen eine bedeutende Rolle bei der Modifikation biologischer Funktionen im gesamten Organismus [19, 22]. Unter physiologischen Bedingungen betrifft dies beispielsweise die Entwicklung von Geweben und Organen, wie Herz oder Niere [25-29], aber auch die Steuerung zellulärer Funktionen, wie Signaltransduktion und Zellproliferation [30-32]. Des Weiteren besitzen miRNAs pathophysiologische Relevanz [23, 25, 33]. So spielen miRNA (miR)-21, miR-29b, miR-30c und miR-192 eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie kardiovaskulärer und renaler Erkrankungen, wie der dilatativen Kardiomyopathie [34, 35], dem Myokardinfarkt [33], der diabetischen Nephropathie (DN) [36] und der CKD [37, 38].

1.4. Die Bedeutung der Proteinexpression für kardiovaskuläre und renale Funktionen

Im Organismus werden viele biologische Funktionen über die Expression von Proteinen bzw. von Proteinisoformen gesteuert [1, 3]. Dabei erfolgt eine situationsgerechte Anpassung durch Beteiligung verschiedenster Faktoren. Das sind u.a. Signalmoleküle, wie Zytokine oder Chemokine und die durch sie gebildeten, interaktiven Netzwerke [1, 39, 40], Rezeptoren, z.B. Integrine [41, 42] und Kinasen, wie die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Akt oder Clks [11, 16, 43, 44]. Auch im Herzen und in der Niere ist Expressionsregulation von Proteinen unter physiologischen wie pathophysiologischen Bedingungen von großer Bedeutung für die Kontrolle kardiovaskulärer und renaler Funktionen [45, 46]. Unter anderem werden die Blutgerinnung [2, 47], die glomeruläre Filtration und Blutdruckregulation [45, 48, 49] aber auch Zellproliferation, Zellüberleben und die Signaltransduktion [31, 43, 50, 51] auf diese Weise gesteuert.

Entscheidenden Einfluss auf Angiogenese, Hämostase und Gefäßwand-homöostase hat das Endothel [2, 47]. Dabei spielt TF, als primärer Initiator der Blutgerinnungskaskade und Regulator der Hämostase eine zentrale Rolle [48]. Im Herzen ist TF von großer Bedeutung für die Hämostase und darüber hinaus für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität und Funktion des Herzens [49, 50]. TF wird als Folge von konstitutiven und alternativen Spleißprozessen in zwei Proteinisoformen exprimiert [2, 51]. „*Full-length*“ (fl)TF vermittelt hauptsächlich die thrombogene/hämostatische Aktivität [52], während die Funktion der wenig-

thrombogenen alternativ gespleißten (as)TF-Isoform nicht vollständig geklärt war [51, 52]. Erste Studien deuteten aber darauf hin, dass asTF möglicher Weise in Tumorgeweben die Angiogenese fördert [53].

Die Expression und Funktion von TF und seinen Isoformen steht in engem Zusammenhang mit der Aktivität von integrinvermittelten Signaltransduktionsprozessen. Zum einen wurde in Monozyten gezeigt, dass die Aktivierung von Integrin (Itg)- $\alpha 4\beta 1$ zur Induktion der TF-Expression führt [54]. Zum anderen induziert die Bindung von löslichem asTF an den Vitronektinrezeptor (Itg- $\alpha v\beta 3$), welcher aus Itg- αv und Itg- $\beta 3$ zusammengesetzt ist, pro-angiogene Prozesse, wie eine erhöhte endotheliale Zellmigration und die Bildung initialer Endothelringstrukturen [12, 42]. Die Aktivierung integrinvermittelter Signalprozesse ist von dem Vorhandensein entsprechenden Bindungspartner in der extrazellulären Matrix abhängig. Neben asTF ist auch das Chemokin Cyr61 (*cysteine-rich 61*) ein solcher Bindungspartner [55, 56]. Es kann ebenfalls an Itg- $\alpha v\beta 3$ binden [40, 41, 55] und spielt eine wichtige Rolle für essenzielle Funktionen des Endothels, wie Angiogenese, Regulation von Entzündungsreaktionen, Wundheilung, Proliferation, Zellüberleben und Chemotaxis [12, 40, 41, 55-57]. Diese Funktionen werden durch Cyr61 mittels der Signaltransduktion über Itg- $\alpha v\beta 3$ vermittelt [40, 41, 55, 56]. Cyr61 sowie Itg- αv werden in verschiedenen mRNA-Spleißvarianten bzw. Isoformen exprimiert [39, 57, 58], die post-transkriptionell über alternative Spleißprozesse entstehen [39, 58]. Welche Bedeutung diese verschiedenen Isoformen haben und wie das alternative Spleißen dieser Faktoren reguliert wird, war bisher unerforscht.

Auch in der Niere gibt es wichtige Faktoren, wie Hormone oder Strukturproteine, welche Nierenfunktionen, wie die Filtration oder die Blutdruckregulation, unter (patho-)pathophysiologischen Bedingungen maßgeblich beeinflussen [59, 60]. Ein wichtiges Beispiel für ein solches Hormon im renalen System ist Angiotensin (Ang)II [61]. Es wird aus dem Vorläuferhormon AngI gebildet und ist für die Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) von essenzieller Bedeutung [59, 62]. AngII spielt pathophysiologisch u.a. beim Bluthochdruck und damit assoziierten Erkrankungen der Niere aber auch des Herzens eine wichtige Rolle [63, 64]. Darüber hinaus besitzt AngII auch eine direkte Wirkungen auf glomerulären Epithelzellen (Podozyten) [65, 66], welche maßgeblich an der Bildung des glomerulären Filters und der Steuerung der Nierenfunktion beteiligt sind [67].

Verschiedene Studien zeigten, dass AngII die Apoptose von Podozyten induziert und maßgeblich an der Podozytenschädigung im Rahmen renaler Erkrankungen, wie der DN, beteiligt ist [65, 66, 68].

Wie schon angedeutet spielen Podozyten eine essenzielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der glomerulären Struktur sowie deren Filtrations- und Barriere-Funktion [67]. Für diese Funktionen ist die Bildung von Strukturproteinen, wie Nephrin oder Podoplanin (PDPN) in Podozyten von zentraler Bedeutung [60, 69, 70]. Pathophysiologisch sind sowohl die Dysfunktion von Podozyten als auch die damit assoziierte Ausbildung einer Proteinurie bzw. Albuminurie wichtige Merkmale bei der Entstehung der Niereninsuffizienz [71, 72]. In verschiedenen Rattenmodellen mit Bluthochdruck und altersabhängig entstehender Albuminurie bzw. einem Rattenmodell für eine durch Puromyzin induzierte Nephrose zeigte sich, dass ein struktureller und funktioneller Verlust von Podozyten mit einer deutlichen PDPN-Verringerung einherging [71, 73, 74]. Ferner führte die Hemmung von PDPN mittels inhibitorischer Antikörper zu einem strukturellen sowie funktionellen Verlust in Podozyten und verursachte die Entstehung einer Proteinurie [60]. Diese Daten belegen, dass PDPN von großer pathophysiologischer Bedeutung für die glomeruläre Struktur und Funktion ist.

1.5. Der Zusammenhang zwischen kardiovaskulären und renalen Funktionen unter (patho-)physiologischen Bedingungen

Es existieren verschiedene physiologische und pathophysiologische Wechselwirkungen (Abbildung 4) zwischen Herz und Niere [75-77]. Über die Interaktion beider Organe werden grundlegende Funktionen, wie der Gefäßtonus oder die haemodynamische Stabilität, aber auch kardiovaskuläre und renale Aufgaben im Allgemeinen beeinflusst [76, 77]. Renale und kardiovaskuläre Funktionen interagieren dabei über verschiedene neurohumorale sowie inflammatorische Systeme, wie das RAAS oder das Zytokin-System [77, 78]. Diese Beziehungen und Interaktionen über Veränderungen der oben genannten Systeme (z.B. RAAS oder Zytokinsekrektion) spielen besonders unter pathophysiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle [45, 78, 79]. So zeigten diverse Studien einen eindeutigen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären und renalen Erkrankungen, wie zwischen Herz- und Niereninsuffizienz [45, 77, 79, 80].

Daraus entwickelte sich der Begriff „kardi-renales Syndrom“ für diesen pathophysiologischen Zusammenhang [45]. Die in diesem Begriff definierten Krankheitsbilder werden - je nach der ursächlichen Erkrankung - in akute und chronische kardi-renale bzw. renokardiale Syndrome sowie sekundäre kardi-renale Syndrome unterteilt [45]. Dies bedeutet, dass eine pathophysiologische Verschlechterung der Herzfunktion, wie bei einer Herzinsuffizienz in eine Niereninsuffizienz (z.B. CKD) münden kann (kardi-renal) [81]. Auf der anderen Seite kann auch eine ursächliche renale Erkrankung, wie eine CKD zu einer Dysfunktion des Herzens oder kardiovaskulären Ereignissen führen (renokardial) [81].

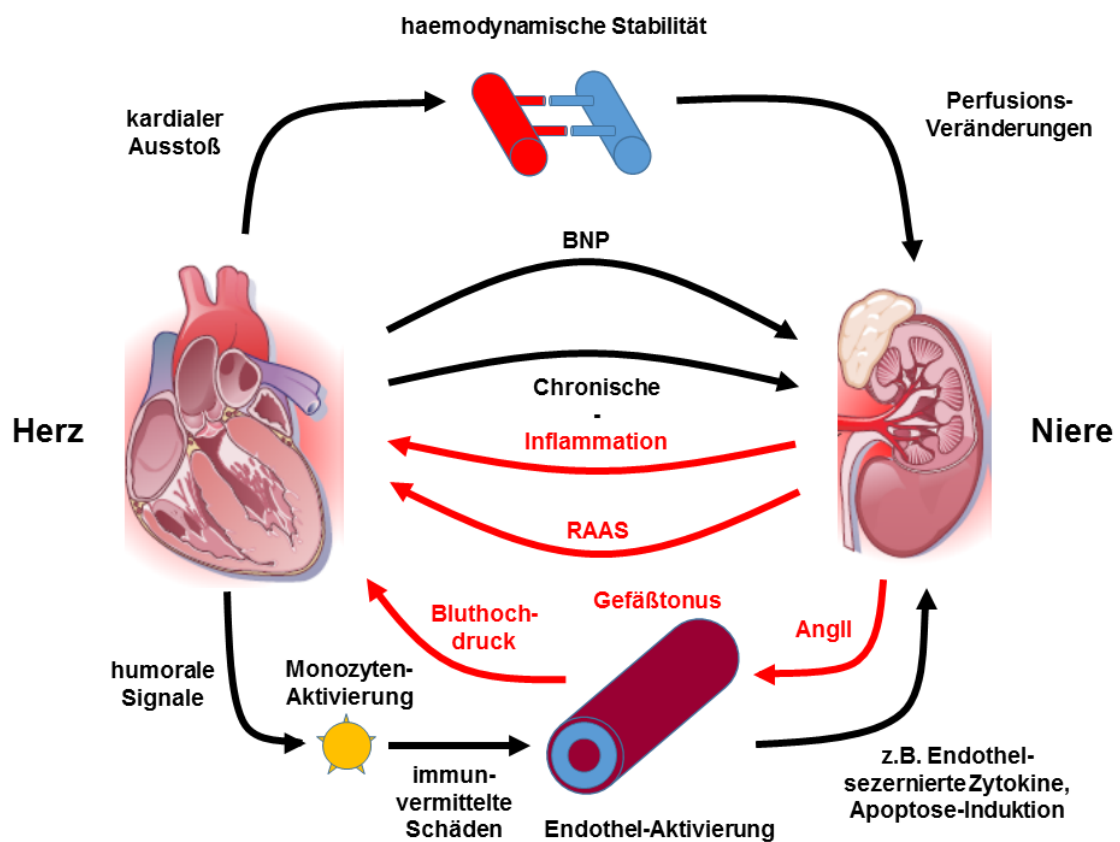


Abbildung 4. Vereinfachte schematische Darstellung möglicher Interaktionen zwischen Herz und Niere. Abgebildet sind einige Beispiele für Wechselwirkungen zwischen dem kardiovaskulären und dem renalen System unter (patho-)physiologischen Bedingungen (modifiziert nach Ronco *et al.*, 2008, *J Am Coll Cardiol.* [45] und Colombo *et al.*, 2012, *Heart Fail Rev.* [78]). Renale Signale und Interaktionen sind rot, kardiovaskuläre Prozesse sind schwarz dargestellt. Angiotensin II (AngII); atriales natriuretisches Peptid (B-Typ; BNP); Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).

Das Herz und die Niere sind unter physiologischen und - ganz besonders - unter pathophysiologischen Bedingungen funktionell eng miteinander verknüpft [75, 80, 81]. Sie bilden insofern ein reno-kardiovaskuläres System. Der enge funktionelle Zusammenhang der beteiligten Organe legt die Vermutung nahe, dass grundlegende Prozesse, wie post-transkriptionelle Regulationsmechanismen, welche direkten Einfluss auf biologische Funktionen des einen Organs nehmen, für das gesamte System relevant sind.

Dies führt zu der Annahme, dass alternative Spleißprozesse bzw. miRNA-vermittelte Prozesse, unterschiedlichen Einfluss auf die Funktionen des kardiovaskulären Systems, z.B. die Regulation der Hämostase oder der Angiogenese, sowie auf biologische Prozesse im renalen System, wie das Zellüberleben von Podozyten haben. Dies könnte besonders unter pathophysiologischen Bedingungen von großer Bedeutung sein.

2. Fragestellung

Im Rahmen der im Folgenden beschriebenen Arbeiten, wurde der Einfluss post-transkriptioneller Regulationsmechanismen, wie das alternative Spleißen und miRNA-vermittelte Prozesse auf die Genexpression verschiedener Faktoren und deren biologische Funktionen in kardiovaskulären und renalen Zelltypen charakterisiert. Dies wurde in geeigneten experimentellen Systemen durchgeführt und im Zusammenhang mit pathophysiologisch-relevanten Bedingungen analysiert. Diesen Untersuchungen lagen folgende Fragestellungen zugrunde:

- a) Wie wird die Expression von kardiovaskulär- bzw. renal-bedeutsamen Faktoren, wie TF, Cyr61, Itg- α v und PDPN, post-transkriptionell gesteuert und welche Faktoren (z.B. SR-Proteine, Kinasen und miRNAs) sind daran beteiligt? Diese Fragestellung wird in den Arbeiten 1, 3, 4 und 5 behandelt.

- b) Welche biologischen Funktionen haben diese Proteine oder Proteinisoformen? Die Studien 1-5 befassen sich mit dieser Fragestellung.

3. Eigene Arbeiten

3.1. Der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg beeinflusst das alternative Spleißen von TF in Endothelzellen

Originalarbeit 1: Eisenreich A, Malz R, Pepke W, Ayrat Y, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells. *Circ J.* 2009;73:1746-52.

Originalartikel unter DOI: <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-99-0225>

Alternatives Spleißen ist eine der wichtigsten post-transkriptionellen Mechanismen der Genexpressionsregulation [8]. Die TF-Isoformexpression wird durch alternative Spleißprozesse auf post-transkriptioneller Ebene kontrolliert [10, 12, 14, 15]. Über die differentielle Expression von fITF und asTF werden essenzielle endotheliale Funktionen, wie die Thrombogenität, die Gefäßhomöostase oder auch die Angiogenese maßgeblich beeinflusst [2, 10, 42]. Erste eigene Untersuchungen deuteten darauf hin, dass SR-Proteinkinasen, wie die Familie der Clks oder Top1 die differentielle TF-Isoformexpression beeinflussen [10]. Eine regulatorische Rolle anderer SR-Proteinkinasen war aber bisher nicht bekannt.

Im Rahmen der hier dargestellten Arbeit untersuchten wir den Einfluss der PI3K/Akt-Achse auf die Isoformexpression asTF und fITF sowie auf die Thrombogenität in humanen Endothelzellen.

Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges führte zu einer Expressionsverringerung von asTF, nicht aber von fITF in humanen Nabelschurendothelzellen (HUVEC). Dies ging mit einer Veränderung des Phosphorylierungsmusters von SR-Proteinen, wie SRp75 und ASF/SF2 einher. Um zu prüfen, ob diese SR-Proteine die TF-Isoformexpression beeinflussen, wurden sie in HUVEC überexprimiert. Die Überexpression von ASF/SF2 und SRp75 führte in unterschiedlicher Form zu differentiellen Veränderungen der Isoformexpression von asTF und fITF. Die über die Inhibition von PI3K/Akt vermittelte Reduktion von asTF hatte keinen signifikanten Einfluss auf die endotheliale Thrombogenität.

Dass diese Regulationsprozesse sich von der Transkriptionsebene abgrenzen, belegten die im Vergleich dazu durchgeführten Experimente zur Inhibition der TF-Transkription. Der Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) steuert die Transkription des TF-Gens (*F3*) und beeinflusst so TF-vermittelte biologische Funktionen, wie die Gefäßhomöostase und die Thrombogenität [48, 82]. Die Inhibition von NFκB in HUVEC führte zu einer Verringerung von asTF und flTF sowie der pro-thrombogenen Aktivität. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Yu und Rak unterstützt, die zeigten, dass die thrombogene Wirkung über flTF vermittelt wird, nicht über asTF [52]. Abschließend demonstrierten wir ferner, dass im Gegensatz zur oben dargestellten Hemmung der asTF-Bildung auf post-transkriptioneller Ebene die Inhibition der NFκB-vermittelten TF-Transkription keinen Einfluss auf das SR-Protein-Phosphorylierungsmuster in HUVEC besaß.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass die PI3K/Akt-Achse an der Regulation der differentiellen TF-Isoform in humanen Endothelzellen beteiligt ist. Dies wird über die Modifikation des Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungszustandes von SR-Proteinen, wie ASF/SF2 und SRp75, vermittelt, welche das alternative Spleißen der TF-mRNA beeinflussen.

3.2. Im kardiovaskulären System wirkt asTF als ein pro-angiogener Faktor

Originalarbeit 2: Eisenreich A, Boltzen U, Malz R, Schultheiss HP, Rauch U. Overexpression of alternatively spliced tissue factor induces the pro-angiogenic properties of murine cardiomyocytic HL-1 cells. *Circ J.* 2011;75:1235-42.

Originalartikel unter DOI: <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-10-0783>

Es gibt zwei natürlich vorkommende proteinogene Isoformen von TF, asTF und flTF [51]. Im kardiovaskulären System wird die Thrombogenität durch flTF vermittelt, während asTF keine messbare pro-thrombogene Aktivität besitzt [10, 52]. Bislang war die biologische Funktion von asTF im Herzen weitgehend unerforscht. Erste Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe deuteten aber darauf hin, dass asTF möglicherweise zu tumorassoziiertem Angiogenese und Wachstum beitragen könnte [53].

Ziel dieser Untersuchung war es, den funktionellen Einfluss der Überexpression von asTF in Kardiomyozyten auf pro-angiogene Prozesse zu charakterisieren.

Die Überexpression von asTF in der Kardiomyozytenzelllinie HL-1 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression pro-angiogener Faktoren, wie VEGF, Cyr61 und *fibroblast growth factor-2* in diesen Zellen. Des Weiteren verstärkte die asTF-Überexpression die HL-1-Zellproliferation. Um zu prüfen, ob die Proliferationssteigerung asTF-spezifisch war, stimulierten wir die Zellen vergleichend mit rekombinant hergestelltem (r-)asTF- bzw. (r-)flTF-Protein. Die Behandlung der HL-1-Zellen mit r-asTF führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der Zellproliferation. Im Gegensatz dazu besaß r-flTF keinen signifikanten Einfluss darauf.

Bei pro-angiogenen Prozessen spielt eine erhöhte Migration von Monozyten und anderen Immunzellen eine wichtige Rolle [83]. In unseren Versuchen zeigte sich, dass der Überstand asTF-überexprimierender Kardiomyozyten die Zellmigration von monozytären THP-1-Zellen induzierte. Kontrollversuche mit r-asTF und r-flTF bestätigten diese Beobachtung. Die Stimulation mit r-asTF, nicht aber mit r-flTF, führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der THP-1-Migration.

Des Weiteren konnten wir darlegen, dass die Behandlung von Endothelzellen mit dem Überstand der asTF-überexprimierenden HL-1-Zellen die Bildung

endothelialer Ringstrukturen induzierte, was ebenfalls ein wichtiger pro-angiogener Prozess ist [84].

Abschließend untersuchten wir den Einfluss von asTF auf die Signaltransduktion in HL-1-Zellen. Die Stimulation dieser Zellen mit r-asTF, sowie die asTF-Überexpression, führte zu einer deutlichen Verringerung der Phosphorylierung von Erk1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) und zu einer Erhöhung der Phosphorylierung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38). Die pharmakologische Hemmung dieser Signalwege führte wiederum zu Veränderungen der Expression von VEGF, Cyr61 und *fibroblast growth factor-2* in ruhenden sowie in r-asTF-behandelten HL-1-Zellen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass asTF die Zellproliferation von Kardiomyozyten, die Chemotaxis monozytärer Zellen sowie das pro-angiogene Verhalten von Endothelzellen verstärkt. Diese Mechanismen werden vermutlich über die Expressionserhöhung pro-angiogener und migrationsfördernder Faktoren, wie VEGF, Cyr61 und *fibroblast growth factor-2* vermittelt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass asTF im Herzen die Zellmigration und Angiogenese fördert.

3.3. SR-Proteinkinasen beeinflussen das alternative Spleißen von Cyr61 und von Itg- α v in Endothelzellen

Originalarbeit 3: Gauck S, Schultheiss HP, Rauch U, Eisenreich A. Modulation of the isoform expression of Cyr61 and integrin- α v in human microvascular endothelial cells. *Cardiovasc Syst.* 2013 1: 8.

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.7243/2052-4358-1-8>

Cyr61 und korrespondierende Integrine, wie Itg- α v, spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung wichtiger endothelialer Funktionen, wie der Angiogenese und der Zellproliferation [41, 56, 85]. Alternative Spleißprozesse führen zur Bildung unterschiedlicher mRNA-Spleißvarianten von Cyr61 und Itg- α v [39, 58]. Wie die Bildung dieser Spleißvarianten gesteuert wird und welchen Einfluss diese auf endotheliale Funktionen haben, war bislang unbekannt.

In diesen Versuchen wurde der regulatorische Einfluss von SR-Proteinkinasen mittels der Inhibition von Top1 und der Clk-Familie auf die Expression der Spleißvarianten von Cyr61 und Itg- α v untersucht. Ferner wurde auch der funktionelle Effekt der entstehenden Isoformen auf die Zellproliferation und das pro-angiogene Verhalten von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) charakterisiert.

Die Hemmung der Clks mittels des pharmakologischen Inhibitors TG003 sowie die Inhibition der Top1 durch Camptothecin führten zu signifikanten Veränderungen der differentiellen Isoformexpression von Cyr61 sowie von Itg- α v auf mRNA- und Proteinebene. Ebenso wurde die Sezernierung von Cyr61 aus den Endothelzellen in das umgebende Zellmedium signifikant verringert. Dieser Einfluss auf die Expression der Cyr61- und Itg- α v-Isoformen zeigte sich sowohl in ruhenden als auch in Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-stimulierten HMEC-1-Zellen. Die inhibitorvermittelte Expressionsveränderung beider Faktoren hatten auch signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation sowie auf die pro-angiogene Bildung endothelialer Ringstrukturen („*tube formation*“; [84]) durch HMEC-1.

Um zu prüfen, ob diese Veränderungen spezifisch durch die Isoformen von Cyr61 bzw. von Itg- α v vermittelt wurden, verwendeten wir rekombinant hergestelltes (r-)Cyr61. Des Weiteren benutzten wir dazu inhibitorische „*small interfering*“

(si)RNAs, welche spezifisch gegen die proteinogene Cyr61-Isoform (Cyr61_IS; [39]) bzw. gegen die nicht-proteinogene Cyr61-Isoform (Cyr61_IR; [39]) gerichtet waren. Die Stimulation der HMEC-1 mit r-Cyr61 erhöhte sowohl die Proliferationsrate, als auch die Bildung endothelialer Ringstrukturen von HMEC-1-Zellen. Im Gegensatz dazu führte die durch siRNAs vermittelte Herunterregulation von Cyr61_IS zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation. Die Blockierung von Cyr61_IR mittels spezifischer siRNAs steigerte die HMEC-1-Zellproliferation. Ferner führte die siRNA-vermittelte Hemmung beider Cyr61-Spleißvarianten zu einer signifikanten Verringerung der pro-angiogene Bildung endothelialer Ringstrukturen.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die SR-Proteinkinasen Top1 sowie die Clk-Familie die differentielle Isoformexpression von Cyr61 und von Itg- α v auf post-transkriptioneller Ebene steuern. Dadurch werden die regenerativen Funktionen von endothelialen Zellen unter physiologischen als auch unter pathophysiologisch-relevanten, pro-inflammatorischen Bedingungen beeinflusst.

3.4. Die Expression beider TF-Isoformen wird durch miR-126 und miR-19a auf post-transkriptioneller Ebene beeinflusst

Originalarbeit 4: Eisenreich A, Rauch U. Regulation of the Tissue Factor Isoform Expression and Thrombogenicity of HMEC-1 by miR-126 and miR-19a. *Cell Biol: Res Ther.* 2013, 2:1.

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2324-9293.1000101>

TF spielt eine bedeutende Rolle für die Steuerung der endothelialen Funktionen [2, 86]. Die Regulation der TF-Expression und Funktion wurde bislang nicht völlig geklärt. Neben alternativem Spleißen gehören miRNA-vermittelte Prozesse zu den bedeutendsten Mechanismen der post-transkriptionellen Genexpressionsregulation [87]. Erste Befunde deuteten darauf hin, dass miR-19 an der Expressionssteuerung von TF in Brustkrebszellen beteiligt sein könnte [88]. Der Einfluss von miRNAs auf die Expression und Aktivität von TF und seinen Isoformen im Endothel wurde aber bislang nicht untersucht.

Im Rahmen der hier dargestellten Studie charakterisierten wir den Einfluss von miR-19a und miR-126 auf die TF-Isoformexpression sowie auf die Thrombogenität in Endothelzellen (HMEC-1).

Die Stimulation der HMEC-1-Zellen mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α führten zu einer signifikanten Verringerung der Expression von miR-19a und miR-126. Die Transfektion der Endothelzellen mit sogenannten miRNA-„hairpin“-Inhibitoren, welche spezifisch gegen miR-19a bzw. miR-126 gerichtet waren, führte zu einer signifikanten Verringerung der asTF- sowie der flTF-Isoformexpression auf mRNA- und Proteinebene.

In silico-Analysen deuteten darauf hin, dass beide miRNAs an die regulatorische 3'UTR der TF-mRNA binden können. Ferner zeigten diese Untersuchungen, dass bei einer Interaktion beider miRNAs mit potentiellen Zielsequenzen innerhalb der TF-mRNA-3'UTR wichtige strukturelle Kriterien erfüllt werden, die eine effektive Hemmung der TF-Expression begünstigen. Diese Kriterien waren: a) eine hohe Komplementarität zur sogenannten „seed“-Region (Nukleotide 2-8) in der 3'UTR der TF-mRNA, b) die Ausbildung einer zentral gelegenen Auswölbung zwischen

beiden Nukleotidstrukturen und c) eine ausreichende Komplementarität im Bereich der Nukleotide 13-16 in der 3'-Region der miRNA [23, 89].

Der funktionelle Einfluss beider miRNAs auf die post-transkriptionelle Steuerung der TF-Expression wurde mittels eines dualen Luciferase-Reporter-Tests analysiert. Aus diesem Test ging hervor, dass miR-19a und miR-126 in der Lage sind, an ihre korrespondierenden Bindesequenzen in der 3'UTR der TF-mRNA zu binden und so die TF-Expression direkt zu regulieren.

Abschließend wurde der Einfluss der Inhibition beider miRNAs auf die flTF-vermittelte pro-thrombogene Aktivität in HMEC-1 untersucht. Die Inhibition von miR-19a bzw. miR-126 in diesen Zellen führte, einhergehend mit der erhöhten Expression beider TF-Isoformen, zu einem signifikanten Anstieg der endothelialen Thrombogenität.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass miR-19a und miR-126 direkt an der post-transkriptionellen Regulation der TF-Isoformexpression und der damit verbundenen pro-thrombogenen Aktivität in humanen Endothelzellen beteiligt sind.

3.5. MiR-29b reguliert auf post-transkriptioneller Ebene die Expression von PDPN, welches das Zellüberleben von Podozyten beeinflusst

Originalarbeit 5: Eisenreich A, Langer S, Herlan L, Kreutz R. Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its antiapoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes. *J Hypertens.* 2016;34:323-31.

Originalartikel unter DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/HJH.0000000000000799>

Das kardiovaskuläre und renale System stehen in Wechselwirkung und engem Kontakt [46]. Dabei spielen post-transkriptionelle Regulationsmechanismen, wie miRNA-vermittelte Prozesse bei kardiorenenalen Interaktionen grundsätzlich eine wichtige Rolle [90-92]. Der Verlust von Podozyten besitzt besonders im Rahmen der Pathophysiologie verschiedener Nierenerkrankungen, wie der CKD, eine große Bedeutung [93]. In diesem Zusammenhang haben initiale Studien im Tiermodellen gezeigt, dass der Verlust an Podozyten sowie eine Verringerung von PDPN mit der Ausbildung einer Proteinurie assoziiert waren, welche beide bedeutende Kennzeichen einer entstehenden CKD sind [60, 71, 72]. Wie diese pathophysiologisch-relevanten Prozesse reguliert werden, war bislang unklar.

Ziel dieser Versuche war es zum einen, die biologische Funktion von PDPN in humanen Podozyten unter normalen und pathophysiologisch-relevanten Bedingungen zu charakterisieren. Zum anderen sollten diese Experimente dazu dienen, den Einfluss potentiell regulatorischen miRNA-Kandidaten, wie miR-29b auf die PDPN-Expression in renalen Zellen zu untersuchen.

Die Expression von miR-29b, nicht aber von miR-497, wurde durch die Stimulation der Podozyten mit AngII signifikant erhöht. Ferner führte AngII zu einer deutlichen Verringerung der PDPN-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Damit einhergehend induzierte die AngII-Stimulation der Podozyten pro-apoptotische Prozesse, wie die Zytochrom C-Translokation aus den Mitochondrien ins Zytoplasma und die Aktivierung von Caspase-3 [94]. Um zu untersuchen, welchen Einfluss PDPN auf das durch AngII induzierte Apoptoseverhalten bzw. das Zellüberleben hat, wurden PDPN-spezifische inhibitorische siRNAs (siPDPN) eingesetzt. Die Transfektion der Podozyten mit siPDPN führte ebenfalls zu einer erhöhten Translokation von Zytochrom C und zu einer verstärkten Aktivierung des

pro-apoptischen Proteins Caspase-3 in AngII-aktivierten Zellen. In ruhenden Podozyten hatte die siPDPN-Behandlung keinen signifikanten Effekt darauf. Das Zellüberleben bei AngII-Stimulation wurde durch die Transfektion der Zellen mit siPDPN ebenfalls verringert, was auch mit einer signifikanten Reduktion der Phosphorylierung von Akt einherging, was ein Signal für gesteigertes Zellüberleben darstellt [43, 95].

Im nächsten Schritt charakterisierten wir den Einfluss von miR-29b und miR-497 auf die Expressionsregulation von PDPN. Die Transfektion der Podozyten mit sogenannten miR-29b-Mimics (künstlich hergestellten miRNAs) führte zu einer deutlichen Reduktion der PDPN-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Die Behandlung der Zellen mit miR-497-Mimics hatte keinen signifikanten Einfluss auf die PDPN-Bildung. Mittels eines dualen Luciferase-Reporter-Tests zeigten wir ferner, dass miR-29b direkt die Expression von PDPN auf post-transkriptioneller Ebene steuern kann, indem es an die entsprechende funktionelle Bindesequenz innerhalb der 3'UTR der PDPN-mRNA bindet.

Diese Daten belegen zum einen, dass PDPN ein anti-apoptischer und überlebensfördernder Faktor in humanen Podozyten unter pathophysiologisch-relevanten Bedingungen, wie unter AngII-Einfluss ist. Zum anderen demonstrierten wir in dieser Arbeit, dass miR-29b die PDPN-Expression in Podozyten auf post-transkriptioneller Ebene hemmt.

4. Diskussion

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten wurden neue experimentelle Daten erarbeitet, welche zum Verständnis der post-transkriptionellen Genexpressionsregulation im kardiovaskulären System und in der Niere beitragen. In diesem Zusammenhang wurde insbesondere die Steuerung alternativer Spleißprozesse als auch der Einfluss und die Regulation miRNA-vermittelter Kontrollprozesse näher beleuchtet. Die hier dargestellten *in vitro*-Untersuchungen wurden in etablierten und geeigneten experimentellen Systemen durchgeführt. Dies erlaubte es, mechanistische Einblicke auf molekularbiologischer Ebene zu erhalten und so Rückschlüsse auf die Beeinflussung entsprechender kardiovaskulärer bzw. renaler Funktionen zu ziehen.

4.1. Die Steuerung und Bedeutung alternativer Spleißprozesse im kardiovaskulären System

Die Veränderung post-transkriptioneller Genexpressionsmechanismen, wie des alternativen Spleißens, hat direkten Einfluss auf verschiedene kardiovaskuläre Funktionen, wie die Aufrechterhaltung der kardialen Struktur und Funktion, die Steuerung der Blutgerinnung aber auch die Signaltransduktion und Zellproliferation [2, 50, 52, 53, 96]. Dabei steuern unterschiedliche Proteinisoformen distinkte Prozesse unabhängig voneinander. Dies geschieht oftmals über unterschiedliche Signalwege und in isoformspezifischer Weise [4, 97-99]. Der folgende Abschnitt wird sich mit der Steuerung alternativer Spleißprozesse und deren funktionellem Einfluss im kardiovaskulären Raum befassen.

4.1.1 SR-Proteine und deren Kinasen spielen eine wichtige Rolle für die Steuerung des alternative Spleißens von TF

Alternatives Spleißen der TF-prä-mRNA führt zur Bildung der zwei Proteinisoformen, asTF und flTF [51, 100]. Wie das alternative Spleißen von TF im kardiovaskulären System gesteuert wird bzw. welche Faktoren daran beteiligt sind, war bislang unklar.

SR-Proteine spielen eine bedeutende regulatorische Rolle im Rahmen alternativer Spleißprozesse [101]. Die Aktivität von SR-Proteinen beim alternativen Spleißen wird über deren Phosphorylierungsstatus gesteuert [102, 103]. Die Phosphorylierung und damit auch die Aktivität sowie die intrazelluläre Lokalisierung von SR-Proteinen wird maßgeblich durch SR-Proteinkinasen, wie Top1, SR-Proteinkinase 1 und 2 oder die Clk-Familie gesteuert [2, 104, 105].

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von V.Y. Bogdanov konnten wir in 2008 zunächst nachweisen, dass die Bindung bestimmter SR-Proteine, wie ASF/SF2 und SRp55 an regulatorische Sequenzabschnitte innerhalb der TF-prä-mRNA direkten Einfluss auf das Herausschneiden von Exon 5 hat [15]. Dies führte zur vermehrten Bildung von asTF [15]. Später fanden Chandradas und Kollegen heraus, dass die Bindung anderer SR-Proteine (SRp40 und SC35) an solche regulatorischen Elemente zu einem entgegengesetzten Effekt führt [14]. Die Interaktion dieser Proteine mit der TF-prä-mRNA vermittelte den Verbleib von Exon 5 in der reifen mRNA und führte damit zu einer vermehrten Bildung der flTF-Isoform [14]. Diese Daten zeigen, dass verschiedene SR-Proteine eine unterschiedliche Wirkung auf das alternative Spleißen der TF-prä-mRNA besitzen [14, 15].

Auf Grund dieser Ergebnisse befassten wir uns in ersten, einführenden Untersuchungen mit der Steuerung dieser Prozesse. Wir analysierten dazu den Einfluss der SR-Proteinkinasen, Top1 und der Clk-Familie auf die differentielle TF-Isoformexpression in pro-inflammatorisch aktivierten humanen Endothelzellen (HUVEC; [10]). Wir zeigten, dass beide Kinasen das Phosphorylierungsmuster und damit auch die Aktivität der SR-Proteine SRp75, SRp55, und SF2/ASF beeinflussten [10]. Ferner führte die Hemmung der Clks zu einer Verringerung beider TF-Isoformen während die Top1-Inhibition die Bildung von asTF erhöhte bzw. die flTF-Expression nahezu vollständig aufhob [10].

Diese ersten Resultate führten uns zu der Frage, ob weitere SR-Proteinkinasen an der Regulation des alternativen Spleißens der TF-prä-mRNA beteiligt sind. Ferner wollten wir wissen, ob es möglich ist, die Expression einer TF-Isoformen zu beeinflussen, ohne die Expression und Funktion der anderen Isoform zu verändern. Im Rahmen der hier vorgestellten Studie zum Einfluss des PI3K/Akt-Signalweges auf die TF-Isoformexpression gelang es uns erstmalig darzulegen, dass dessen pharmakologische Inhibition zu einer direkten Hemmung der Expression von asTF, nicht aber von flTF in pro-inflammatorisch stimulierten HUVEC führte [106]. Das

fITF-vermittelte pro-thrombogene Potential der HUVEC wurde durch die Verringerung der asTF-Expression nicht verändert [106]. Schon 2004 gelang Blaustein und Kollegen der Nachweis, dass die PI3K/Akt-Achse das alternative Spleißen von Fibronektin reguliert [107]. In nachfolgenden Arbeiten konnten sie und andere diesen Einfluss auf alternative Spleißprozesse untermauern und zeigten, dass dies über Modifikationen der Phosphorylierung von SR-Proteinen vermittelt wird [16, 108]. Diese Ergebnisse unterstützen daher die von uns gemachten Beobachtungen, dass der PI3K/Akt-Signalweg das alternative Spleißen von TF beeinflusst [106]. Dass die PI3K/Akt-Achse die TF-Isoformexpression auf post-transkriptioneller Ebene und nicht auf transkriptioneller Ebene beeinflusst, bestätigen die Ergebnisse unserer Kontrollversuche. In diesen Experimenten führte die Inhibition der durch NFκB vermittelten Transkription von TF [109] erwartungsgemäß zu einer Verringerung beider Isoformen, asTF und fITF sowie zur Hemmung der fITF-abhängigen endothelialen Thrombogenität [106].

Unsere Daten demonstrieren ferner, dass die Hemmung der PI3K/Akt-Achse zu Veränderungen des Phosphorylierungszustandes der SR-Proteine SRp75, SRp55 und SF2/ASF führte [106]. Diese Beobachtungen werden durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen untermauert [16, 107, 108]. Schon 2001 gelang es Patel und Kollegen zu zeigen, dass die pharmakologische Hemmung der PI3K/Akt-Achse einen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von SR-Proteinen, wie SRp40, in Skelettmeyoblasten besitzt [108]. Dies wurde einige Jahre später durch die Arbeiten von Blaustein *et al.* bestätigt [107]. In Übereinstimmung mit unseren Daten fanden sie heraus, dass die PI3K/Akt-Achse die Phosphorylierung der SR-Proteine ASF/SF2 und 9G8 in Brustepithelzellen steuert [107]. Diese Beobachtungen führten zu der Erkenntnis, dass Akt eine SR-Proteinkinase ist, deren Aktivität über die PI3K kontrolliert wird [16].

Kürzlich zeigten Han *et al.*, dass die Überexpression der SR-Proteine ASF/SF2 und SC35 zu einer direkten Veränderung des alternativen Spleißens der Ca²⁺/Calmodulin-anhängigen Proteinkinase II-prä-mRNA in murinen embryonalen Fibroblasten führt [110]. Im Zusammenhang mit dem alternativen Spleißen von TF fanden Tardos und Kollegen heraus, dass die Hemmung der Anbindung von SF2/ASF bzw. SRp55 an regulatorische Motive innerhalb der TF-prä-mRNA mit vermehrtem Herausschneiden von Exon 5 und einer erhöhten asTF-Expression in humanen Monozyten einhergeht [15]. Dies bestätigend, demonstrieren

Chandradas *et al.* umgekehrt, dass die verstärkte Bindung von ASF/SF2 und SRp55 an die TF-prä-mRNA den Einschluss von Exon 5 und die Bildung von flTF in humanen Monozyten fördert [14]. Des Weiteren führte die Interaktion von SC35 bzw. SRp40 mit der TF-prä-mRNA zu einem vermehrten Herausspleißen von Exon 5 und damit zu einer gesteigerten asTF-Bildung in diesen Zellen [14]. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen gelang es uns zum ersten Mal zu belegen, dass die Überexpression der SR-Proteine ASF/SF2 bzw. SRp75 allein oder zusammen einen direkten Einfluss auf die Bildung von flTF bzw. asTF in humanen Endothelzellen besaß [106]. Dies könnte möglicher Weise über eine verstärkte Bindung dieser SR-Proteine an entsprechende regulatorische Elemente in der TF-prä-mRNA vermittelt werden, wie es von Tardos *et al.* und Chandradas *et al.* beschrieben wurde [14, 15].

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Studie erstmalig darauf hin, dass neben Clks und Top1 auch die PI3K/Akt-Achse die endotheliale TF-Isoformexpression auf post-transkriptioneller Ebene beeinflusst. Dies wird möglicher Weise über die Phosphorylierung von SR-Proteinen, wie ASF/SF2 und SRp75, vermittelt, welche einen direkten und differentiellen Einfluss auf die Bildung von asTF bzw. flTF haben.

4.1.2 AsTF wirkt im kardiovaskulären System pro-angiogen und proliferationssteigernd

TF wird in zwei Proteinisoformen exprimiert, flTF und asTF [2, 51]. Die biologische Funktion der flTF-Isoform ist gut erforscht. flTF spielt in erster Linie eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Blutgerinnungskaskade [52]. Daneben ist flTF an der Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität des Herzens, der Gefäßwandhämostase und der durch PAR-2 vermittelten Signaltransduktion beteiligt [2, 49, 50, 98]. Im Gegensatz zu flTF, besitzt die asTF-Isoform keine nachweisbare pro-thrombogene Aktivität [10, 52]. Bislang war ihre Rolle im kardiovaskulären System noch weitgehend unklar, obwohl erste Daten darauf hindeuteten, dass asTF möglicher Weise die Tumorangio-genese fördern könnte [53].

fITF wird konstitutiv in diversen Geweben und Zelltypen, wie dem Herzen, der Lunge und in Kardiomyozyten exprimiert [44, 86]. In anderen Geweben und Zellen ist die Bildung von fITF induzierbar, wie im Endothel oder in Monozyten [10, 51, 82]. Die Expression der alternativ gespleißten Isoform von TF wurde erstmals im Jahre 2003 von Bogdanov und Kollegen beschrieben [51]. Dort wurde asTF u.a. in Lunge, Pankreas aber auch in Monozyten detektiert [51]. Später zeigte sich, dass es auch in anderen Geweben, wie in Tumoren, im Herzen oder in Endothelzellen gebildet wird [10, 12, 43, 44, 53]. Die Funktion von asTF war lange unbekannt. Zunächst wurde vermutet, dass es, ähnlich wie fITF, pro-thrombogene Eigenschaften besitzt [51]. Dies konnte aber nie überzeugend belegt werden [10, 106, 111]. Im Jahr 2007 präsentierten Hobbs *et al.* erstmalig Daten, die darauf hinwiesen, dass asTF das Tumorstadium über die Erhöhung der tumorassoziierten Angiogenese fördern könnte [53]. Da die Rolle von asTF im kardiovaskulären Bereich weitgehend unklar war, befassten wir uns aufgrund dieser ersten Befunde mit der Untersuchung eines potentiell pro-angiogenen Einflusses von asTF in Kardiomyozyten. Im Rahmen der von uns durchgeführten Studie gelang es uns zum ersten Mal zu demonstrieren, dass die Überexpression von asTF, nicht aber von fITF, die Zellproliferation muriner HL-1-Kardiomyozyten signifikant steigerte [112]. Diese Daten werden durch die Befunde von Hobbs und Kollegen untermauert, die ebenfalls zeigten, dass die asTF-Überexpression in humanen Pancreaskarzinomzellen (MiaPaCa-2) mit einem gesteigerten Tumorstadium *in vivo* verbunden ist [53]. In späteren Studien bestätigte sich dieser proliferationsfördernde Effekt von asTF auch *in vitro* u.a. in Brustkrebs- sowie in Lungenkarzinomzellen [12, 113, 114].

Neben diesem proliferationsfördernden Effekt zeigten die Ergebnisse unserer Studie ferner, dass asTF weitere pro-angiogene Eigenschaften besitzt [112]. Bei pro-angiogenen Prozessen spielt die Migration von monozytären Zellen und anderen Immunzellen eine wichtige Rolle [83, 115, 116]. Die Attraktion von monozytären Zellen und deren gerichtete Migration spielt eine wichtige regenerative Rolle nach ischämischen Ereignissen [116, 117]. So legten Capoccia *et al.* in einem Mausmodell dar, dass die frühzeitige Mobilisierung von Monozyten bei einem Gefäßverschluss der unteren Extremitäten die Angiogenese fördert und so die Reperfusion des ischämischen Gewebes verbessert [117]. Unter anderem sezernieren solche Monozyten und anderen Immunzellen, z.B. Makrophagen pro-

angiogene Faktoren, wie FGF2 oder VEGF [115, 116]. Diese aktivieren wiederum das Endothel und induzieren pro-angiogene Prozesse. Dies sind beispielsweise Expressionsveränderungen pro- bzw. anti-angiogener Faktoren, die Bildung von angiogenen Primärformationen, wie endothelialen Ringstrukturen („*tube formation*“; *in vitro*) oder die Gefäßsprossung („*sprouting*“; *in vivo*) [115, 116].

Im Rahmen unserer Studie konnten wir demonstrieren, dass der Überstand asTF-überexprimierender Kardiomyozyten die Zellmigration von monozytären THP-1-Zellen induzierte [112]. Kontrollversuche mit r-asTF bestätigten den promigratorischen Einfluss von asTF auf Monozyten. Ferner zeigten unsere Versuche, dass die Stimulation von HL-1-Kardiomyozyten mit r-asTF zu Veränderungen der intrazellulären Signaltransduktion über Erk1/2 oder p38 führte [112]. Ferner führte die Hemmung der zuvor genannten Signalmoleküle zu einer veränderten Expression der pro-angiogener Faktoren VEGF, FGF2 und Cyr61 [112]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Studien in Lungenkarzinomzellen [12]. Erk1/2- und p38-vermittelte Signaltransduktionsprozesse spielen bei der Migration von Monozyten sowie anderen pro-angiogenen Prozessen eine wichtige Rolle [118, 119]. Sapharikas und Kollegen fanden heraus, dass Erk1/2- und p38-vermittelte Signaltransduktionsprozesse an der Steuerung der Migration von Monozyten, wie THP-1-Zellen im Rahmen pro-angiogener Prozesse beteiligt sind [118]. Ferner demonstrieren Pan *et al.* kürzlich, dass die Interaktion beider Signalwege die Expression angiogener Moleküle, wie VEGF, reguliert [119]. Diese Ergebnisse unterstützen die von uns erhobenen Befunde.

Neben der Induktion der monozytären Chemotaxis stimulierte der Überstand asTF-überexprimierender Kardiomyozyten auch die Bildung primärer endothelialer Ringstrukturen *in vitro* [112]. Die Bildung solcher primärer endothelialer Ringstrukturen spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese [84, 116]. Unsere Resultate wurden durch die Arbeit von van den Berg und Kollegen bestätigt, die ebenfalls zeigten, dass asTF die Angiogenese fördert [42]. Sie konnten in ähnlicher Form darlegen, dass die Behandlung von Endothelzellen mit r-asTF *in vitro* die Bildung primärer Ringstrukturen fördert. *In vivo* bestätigten sie diesen Befund und zeigten, dass r-asTF auch die Sprossung von Gefäßen im Mausmodell induzierte [42]. In Ihrer Arbeit demonstrieren sie ferner, dass diese asTF-induzierten pro-angiogenen Prozesse, anders als flTF-assoziierte Vorgänge, nicht über PAR-2-Signaltransduktion, sondern über Integrine, wie Itg- α v β 3, vermittelt wurden [42].

Auch in unseren Versuchen bestätigte sich, dass die asTF-induzierten pro-angiogenen Prozesse in Kardiomyozyten unabhängig von PAR-2 vermittelt wurden [99, 112]. Im Rahmen der von uns durchgeführten Experimente wurde der Einfluss integrinvermittelter Signaltransduktion nicht weitergehend untersucht. Dies führte uns daher zu dem Schluss, dass die pro-angiogenen Eigenschaften von asTF in Kardiomyozyten, möglicherweise und zumindest zum Teil über Signaltransduktionsprozesse durch Erk1/2 und p38 sowie die Expression pro-angiogener Proteine, wie VEGF, Cyr61 und FGF2 vermittelt werden.

Neben diesen proliferationsfördernden und pro-angiogenen Effekten von asTF zeigten wir erstmalig im Rahmen einer kürzlich durchgeführten Studie, dass asTF auch als anti-apoptotischer bzw. als zellüberlebensfördernder Faktor in Kardiomyozyten wirkt [43]. Dort zeigte sich, dass die Überexpression von asTF in primär isolierten Kardiomyozyten sowie in HL-1-Zellen zu einer Verringerung der durch TNF- α induzierten Apoptose führte. Dies wurde über Itg- α v β 3-Signaltransduktion und unter Beteiligung von Akt und NF κ B vermittelt [43]. Die Daten anderer Arbeitsgruppen, welche zeigen, dass asTF-vermittelte Prozesse, wie die Angiogenese oder das Brustkrebswachstum, über die Wechselwirkung von asTF mit Integrinen vermittelt werden, untermauern unsere Befunde. [42, 99, 114].

Zusammenfassend weisen diese Studien darauf hin, dass asTF eine bedeutende Rolle im kardiovaskulären System besitzt. Die isoformspezifische Bedeutung erhält asTF dadurch, dass es biologische Funktionen, wie die Steuerung der Angiogenese, des Zellüberlebens und der Proliferation über spezifische Signaltransduktionswege bestimmt. Diese sind unabhängig von ItTF und damit assoziierten PAR-2-vermittelten Signalprozessen [12, 42, 99, 112].

4.1.3 Das alternative Spleißen von Cyr61 und Itg- α β 3 beeinflusst die regenerativen Eigenschaften von Endothelzellen

Die bis hierhin beschriebenen Daten deuten darauf hin, dass alternative Spleißprozesse über die Bildung von α 5TF Einfluss auf kardiovaskuläre Funktionen, wie die Angiogenese oder die Zellproliferation, nehmen [11, 12, 106, 112]. Ferner wird dies möglicherweise über Chemokine, wie Cyr61, und deren Interaktionspartner, wie Itg- α β 3, vermittelt [12, 42, 112]. Um diesen Zusammenhang näher zu beleuchten, beschäftigten wir uns nun mit der Frage, ob und wie diese Faktoren durch alternatives Spleißen beeinflusst werden und welchen funktionellen Einfluss die entstehenden Spleißvarianten im Endothel besitzen.

Regenerative Funktionen des Endothels, wie die Zellreproduktion oder die Angiogenese, werden u.a. über Signaltransduktionsmechanismen gesteuert, an denen beispielsweise Zytokine, Chemokine sowie deren Rezeptoren beteiligt sind [32, 40, 41, 55, 83]. Cyr61 und seine korrespondierenden Interaktionspartner, wie Itg- α β 3 spielen eine entscheidende Rolle bei der Steuerung dieser Signalprozesse sowie verschiedener, endothelialen Funktionen, wie der Zellproliferation und der Angiogenese [41, 56, 85]. Alternatives Spleißen der Prä-mRNAs von Cyr61 bzw. der Itg- α -Untereinheit führen zur Bildung verschiedener mRNA-Spleißvarianten [39, 58]. Wie diese post-transkriptionellen Mechanismen gesteuert werden, war allerdings bislang unerforscht.

Im Rahmen unserer Versuche gelang es uns erstmalig zu belegen, dass die SR-Proteinkinasen, Top1 sowie die Clk-Familie an der Regulation des alternativen Spleißens der Cyr61- bzw. Itg- α β 3-prä-mRNA beteiligt sind [120]. Hirschfeld und Kollegen zeigten 2009 in einem experimentellen Brustkrebsmodell, dass hypoxischer Stress das alternative Spleißen von Cyr61 induziert [39]. Unter normoxischen Bedingungen wurde vermehrt die nicht-proteinogene Cyr61_{IR}-mRNA gebildet, in der Intron 3 aus der reifen mRNA nicht herausgespleißt wird [39]. Im Gegensatz dazu induzierte Hypoxie das Herausschneiden von Intron 3 aus der Prä-mRNA, was zu einer verstärkten Bildung der proteinogenen und funktionellen Cyr61_{IS}-Isoform führte [39]. In ähnlicher Weise zeigten auch unsere Ergebnisse, dass ein pathophysiologisch-relevanter Stimulus, wie TNF- α das alternative Spleißen der Cyr61-prä-mRNA differentiell verändert [120]. Die

Behandlung von humanen Endothelzellen mit dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF- α führte zu einer erhöhten Expression der proteinogenen Cyr61_IS-Spleißvariante, während die Bildung von Cyr61_IR deutlich verringert wurde [120]. Dieser Befund bestätigte sich auch in anderen Studien [57, 121]. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Expressionsanalyse der Itg- α v-Spleißvarianten (Itg- α v_1, 2 und 3) [120]. Die Aktivierung der Endothelzellen mit TNF- α erhöhte die Expression der proteinogenen Itg- α v_1-Form, während die Bildung der Spleißvarianten Itg- α v_2 und Itg- α v_3 vermindert wurde [120]. In diesem Zusammenhang waren wir erstmalig in der Lage zu zeigen, dass ein pathophysiologisch-relevanter Reiz das alternative Spleißen der Itg- α v-prä-mRNA differentiell beeinflusst. Es gibt bislang keine vergleichbaren Daten zur post-transkriptionellen Spleißinduktion dieses Integrins. Erste frühe Befunde aus dem Jahre 1998 deuten aber auf einen ähnlichen Mechanismus für die Expressionskontrolle von zwei Itg- β 5-mRNA-Spleißvarianten in murinen Makrophagen hin [122]. Die Adhäsion dieser Makrophagen, welche u.a. im Rahmen von entzündlichen Vorgängen bei der Immunantwort eine Rolle spielt, führte im Mausmodell zu einer erhöhten Bildung beider Itg- β 5-mRNA-Spleißformen [122]. In diesem Zusammenhang untermauern diese Daten unsere Beobachtungen zur Expressionsveränderung von Itg- α v-Spleißvarianten in humanen Endothelzellen unter entzündlichen Bedingungen.

Ein weiteres Resultat unserer Untersuchungen war, dass die SR-Proteinkinasen Top1 und die Clk-Familie post-transkriptionell Einfluss auf die endotheliale Bildung der Cyr61- und der Itg- α v-Spleißvarianten nahmen [120]. Der spezifische Einfluss pharmakologischer Inhibition dieser SR-Proteinkinasen, wie TG003 und Camptothecin, wird durch die Ergebnisse früherer Studien zur Steuerung des alternativen Spleißens der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase bzw. von TF belegt [10, 11, 123]. Ferner wird die Wirksamkeit dieser Inhibitoren bezüglich alternativer Spleißprozesse auch in verschiedenen Arbeiten anderer Gruppen bestätigt [124-127]. So zeigten Solier und Kollegen, dass die spezifische Hemmung von Top1 mittels Camptothecin signifikanten Einfluss auf das Prä-mRNA-Spleißen des Caspase-2-Transkriptes in verschiedenen humanen Krebszelllinien besaß [127]. Kürzlich demonstrierten Li *et al.* in ähnlicher Form, dass die pharmakologische Inhibition der Clk-Familie mittels TG003 das alternative Spleißen der Proteinkinase C- β II-prä-mRNA in murinen 3T3-L1-prä-Adipozyten

hemmte [124]. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigten unsere Ergebnisse, dass die Hemmung der Clks sowie der Top1 mittels Camptothecin bzw. TG003 einen differentiellen Einfluss auf die endotheliale Expression der Spleißvarianten von Cyr61 und Itg- α v unter normalen bzw. pro-inflammatorischen Bedingungen besaß [120]. In diesem Zusammenhang ging die Reduktion einer mRNA-Variante meist mit der Induktion der korrespondierenden Spleißform einher [120]. So führte z.B. die Inhibition von Top1 in ruhenden wie auch in entzündlich-stimulierten Endothelzellen zu einer signifikanten Verringerung der Expression von Cyr61_{IS}. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der Cyr61_{IR}-Spleißform unter diesen Bedingungen erhöht [120]. Diese Form der gegensätzlichen Steuerung der Expression zweier korrespondierender mRNA-Spleißvarianten findet sich auch bei verschiedenen anderen Beispielen, wie bei der Spleißregulation der Bcl-2-like 1 (Bcl-x)-prä-mRNA oder der Isoformexpression von endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase, TF und dem Tumorsuppressor p53 [10, 11, 128, 129]. Die Beteiligung von SR-Protein-Kinasen, wie Top1 und der Clk-Familie, wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls beschrieben [10, 129, 130], was die von uns erhobenen Daten unterstützt.

Die Ergebnisse unserer Versuche zeigten, dass die pharmakologische Hemmung der Clks bzw. von Top1 einen deutlichen Einfluss auf die Proliferation der Endothelzellen besaß [120]. Des Weiteren wurde dadurch auch die Bildung endothelialer Ringstrukturen sowohl in ruhenden als auch in pro-inflammatorisch aktivierten Zellen verringert [120]. Dieser Befund wird durch die Daten anderer Gruppen untermauert. Diese zeigten, dass die Inhibition von SR-Proteinkinasen und der dadurch gesteuerten Spleißprozesse Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse, wie das Zellwachstum, die Apoptose oder das pro-angiogene Potenzial besitzt [129, 131, 132]. In diesem Zusammenhang demonstrierten Nowak *et al.* 2008, dass die TG003-vermittelte Clk-Hemmung in „*transforming growth factor* β 1“-aktivierten primären Epithelzellen zu einer gesteigerten Bildung der pro-angiogenen VEGF₁₆₅-Isoform führte [131]. Unter diesen Bedingungen wurde die Bildung der korrespondierenden anti-angiogenen Spleißform (VEGF_{165b}) verringert [131]. Kürzlich zeigten Araki und Kollegen in ähnlicher Form, dass die pharmakologische Inhibition von Clk1 zu einem veränderten Spleißen der *ribosomal protein S6 kinase* beta-1-mRNA in MDA-MB-468-Brustkrebszellen führte [132]. Dies war mit einer direkten Verringerung der

Zellviabilität und des Wachstums dieser Zellen verbunden [132]. In ähnlicher Form weisen auch unsere Daten darauf hin, dass die durch den Clk- bzw. Top1-Inhibition induzierte Veränderung der endothelialen Zellfunktionen - zumindest zum Teil - über die Modifikation von alternativen Spleißprozessen vermittelt wurde [120]. Dies belegten die durchgeführten Kontrollversuche. Die siRNA-vermittelte spezifische Hemmung der proteinogenen Cyr61_IS-Form führte zu einer signifikanten Verringerung der endothelialen Proliferation, während die Inhibition der nicht-proteinogenen Cyr61_IR-Spleißvariante die Zellproliferation verstärkte [120]. Im entsprechenden Umkehrexperiment zeigte sich, dass die Behandlung der Endothelzellen mit der proteinogenen Cyr61_IS-Isoform mit einer deutlichen Erhöhung der Zellproliferation einherging [120]. Ferner deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die siRNA-vermittelte Herunterregulation der proteinogenen Cyr61_IS-Form zu einer Verringerung des pro-angiogenen Potentials der Endothelzellen führte [120]. Umgekehrt förderte die Behandlung der Zellen mit rekombinantem Cyr61_IS-Protein die pro-angiogene Bildung von endothelialen Ringstrukturen [120]. Arbeiten anderer Gruppen bestätigen diese Befunde. Darin wird u.a. gezeigt, dass die biologischen Funktionen von Cyr61, wie die Immunzellmigration und die tumorassoziierte Angiogenese, durch die proteinogene Cyr61_IS-Form vermittelt werden [39, 57].

Zusammenfassend weisen die von uns erhobenen Daten darauf hin, dass Top1 sowie die Clk-Familie das alternative Spleißen von der Prä-mRNA von Cyr61 und Itg- α v in humanen Endothelzellen auf post-transkriptioneller Ebene modifizieren. Ferner hat dies einen signifikanten Einfluss auf regenerative Funktionen des Endothels, wie die Zellproliferation und pro-angiogene Prozesse sowohl unter normalen als auch unter pathophysiologisch-relevanten, pro-inflammatorischen Bedingungen.

4.2. Der Einfluss miRNA-vermittelter post-transkriptioneller Regulationsmechanismen der Genexpression im kardiovaskulären und renalen System

Neben alternativem Spleißen spielen auch miRNA-vermittelte Prozesse eine bedeutende Rolle bei der Steuerung der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene [19, 20, 25, 27, 87, 89]. Die Modifikation miRNA-vermittelter

Genexpressionsmechanismen hat direkten Einfluss auf die Steuerung (patho-)physiologisch-relevanter Funktionen, wie der Blutdruckregulation, der Elektrolythomöostase, der Herzhypertrophie, der Thrombogenität sowie der Signaltransduktion im kardiovaskulären System und der Niere [23, 25, 28, 30]. Diese funktionellen Einflüsse von miRNAs auf biologischen Funktionen werden über die Translationshemmung distinkter Ziel-mRNAs auf post-transkriptioneller Ebene vermittelt [23, 89]. Dieser Teil der Habilitationsschrift wird sich mit dem Einfluss miRNA-vermittelter Mechanismen auf biologische Funktionen im kardiovaskulären sowie im renalen Raum, unter Berücksichtigung der von uns erhobenen Daten befassen.

4.2.1 Die endotheliale Thrombogenität wird durch die miRNA-vermittelte Kontrolle der TF-Isoformexpression moduliert

Wie bisher eingehend dargestellt, spielt das alternative Spleißen eine wichtige Rolle bei der Steuerung der flTF-assoziierten pro-thrombogenen Aktivität bzw. der asTF-vermittelten regenerativen Eigenschaften des Endothels, auf post-transkriptioneller Ebene [10, 15, 42, 43, 106, 112]. Welchen funktionellen Einfluss miRNA-vermittelte post-transkriptionelle Prozesse auf die TF-assoziierten Funktionen des Endothels haben und welche pathophysiologische Relevanz dies hat, war aber bislang unklar.

Schon 2011 gelang es Zhang und Kollegen zu zeigen, dass die Expression von Gesamt-TF in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 durch die Inhibition von miR-19, welche die Formen miR-19a und b einschließt, erhöht wird. [88] Ferner fanden sie heraus, dass die Transfektion von humanen MDA-MB-231-Brustkrebszellen mit miR-19-Mimics zu einer deutlichen Verringerung der Gesamt-TF-Expression führte [88]. In Übereinstimmung mit diesen ersten Daten konnten wir einige Jahre später zum ersten Mal demonstrieren, dass miR-19a sowie miR-126 die Expression der beiden TF-Isoformen, asTF und flTF in humanen Endothelzellen (HMEC-1) hemmen [133]. Dies zeigten wir sowohl unter normalen als auch unter pro-inflammatorischen Bedingungen [133]. Vermittelt wurde dieser Effekt über eine direkte Bindung dieser miRNAs an die regulatorische 3'UTR der TF-mRNA [133]. Nachfolgende Studien anderer Gruppen unterstützen die von uns erhobenen Daten zum Einfluss von miR-19a und miR-126 auf die TF-Expression [134-136]. So

zeigten Yu und Kollegen, dass miR-19a die Gesamt-TF-Expression in Darmkrebszellen hemmt und so deren Migration und Invasion beeinflusst [135]. 2014 demonstrierten Li *et al.*, dass die Transfektion humaner endothelialer EA.hy926-Zellen bzw. von humanen Nabelschnurendothelzellen mit miR-19b zu einer Verringerung der Gesamt-TF-Expression führt [136]. Dies wurde ebenfalls über eine direkte Interaktion dieser miRNA mit der TF-3'UTR vermittelt [136]. Ferner zeigten kürzlich Witkowski und Kollegen, in enger methodischer und redaktioneller Anlehnung an die von uns durchgeführten Untersuchungen [133], dass miR-126 die Expression von fITF und asTF in ruhenden und pro-inflammatorisch-aktivierten mikrovaskulären Endothelzellen verringert [134]. Ebenso wie zuvor durch uns erstmalig gezeigt [133], wurde dies über die Bindung von miR-126 an die 3'UTR von TF induziert [134]. Ferner wurden in den letzten Jahren weitere miRNAs, wie miR-223 und miR-520g entdeckt, welche die Expression von Gesamt-TF im Endothel und anderen Geweben beeinflussen [137, 138].

Die Ergebnisse unserer Experimente belegten im weiteren erstmalig, dass miR-126 sowie miR-19a einen direkten funktionellen Einfluss auf die endotheliale Thrombogenität besitzen, welcher über die Expressionssteuerung von asTF und besonders von fITF vermittelt wurde [133]. Diese Beobachtung wurde durch spätere Studien bestätigt [134, 136, 138]. 2014 zeigten Li und Kollegen, dass die Überexpression von miR-19b in endothelialen EA.hy926-Zellen zu einer signifikanten Verringerung der Expression und der pro-thrombogenen Aktivität von TF führte [136], welche hauptsächlich über fITF vermittelt wird [52]. In ähnlicher Weise demonstrierten Witkowski *et al.*, in enger Anlehnung an die von uns gemachten Versuche [133], dass die Transfektion von humanen THP-1-Zellen mit miR-126-Mimics die fITF-Expression und damit auch die Thrombogenität dieser Zellen signifikant verringerte [134]. Ferner deuten die von Witkowski und Kollegen erhobenen Daten darauf hin, dass dieser Mechanismus von pathophysiologischer Relevanz im Rahmen vaskulärer Entzündungsprozesse bei Diabetes mellitus sein könnte [134]. Der funktionelle Einfluss von miR-19a wurde auch in einem anderen experimentellen Zusammenhang beschrieben. So fanden Yu *et al.* 2013 heraus, dass die miR-19a-vermittelte Hemmung der Gesamt-TF-Expression in Darmkrebszellen deren Migration und Invasion hemmte [135]. Ferner zeigte eine spätere Studie von Li und Kollegen, dass eine andere miRNA, nämlich miR-223,

einen signifikanten Einfluss auf die endotheliale Thrombogenität besitzt [138]. Sie zeigten, dass die Überexpression von miR-223 in EA.hy926-Zellen die prothrombogene TF-Aktivität über die Verringerung von Gesamt-TF hemmte [138]. Die Ergebnisse dieser Studien deuten darauf hin, dass die endotheliale Thrombogenität, welche maßgeblich über fITF-vermittelt wird [10, 52, 111], posttranskriptionell über die Bindung von miRNAs, wie miR-19a/b, miR-126 oder miR-223, an regulatorische Bereiche innerhalb der 3'UTR der TF-mRNA gesteuert wird. Ferner scheint dieser Regulationsmechanismus sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch von Bedeutung zu sein, wie bei entzündlichen Bedingungen, im Rahmen von Krebserkrankungen oder bei Diabetes mellitus [88, 133-135].

4.2.2 Die funktionelle Bedeutung der miRNA-vermittelten Regulation von PDPN in Podozyten

Verschiedene miRNAs, wie miR-126, miR-19a, miR-29b und miR-497 spielen im kardiovaskulären System eine wichtige Rolle insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen [139-142]. So zeigten Potus *et al.* im kardiovaskulären System, dass die Expression von miR-126 in Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant erniedrigt ist [141]. Ferner demonstrierten Witkowski und Kollegen, dass eine erniedrigte Expression von miR-126 in Patienten mit Diabetes mellitus mit einer erhöhten vaskulären TF-Expression und Thrombogenität einhergeht [134]. Ähnliche Assoziationen zu verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen, wie akuten Myokardinfarkten, Herzinsuffizienz oder abdominalen Aortenaneurysmen, konnten auch für miR-19a, miR-29b und miR-497 aufgezeigt werden [139, 140, 142]. Einige dieser kardiovaskulär bedeutsamen miRNAs, wie miR-126, miR-19a und miR-497, spielen auch bei der Pathophysiologie renaler Erkrankungen, wie DN oder renalen Krebsformen, eine Rolle [143-145]. So fanden Al-Kafaji und Kollegen heraus, dass die DN mit einer verringerten Expression von miR-126 assoziiert ist [144]. In verschiedensten Studien wurde dargelegt, dass miR-126, miR-19a, miR-497 sowie miR-29b im Rahmen kardiovaskulärer bzw. renaler Erkrankungen im Blut zirkulieren können [139, 142, 144, 146]. Die Zirkulation solcher miRNAs wird über einen Transportmechanismus ermöglicht, bei dem diese miRNAs in Vesikeln/Mikropartikeln eingeschlossen sind,

die von einer Donorzelle abgeschnürt und dann in Körperflüssigkeiten, wie das Blut, abgegeben werden [147]. Über die Blutzirkulation können diese miRNAs dann zu anderen Geweben oder Organen bzw. den entsprechenden Rezipientenzellen transportiert werden [147]. Dort werden sie über die Aufnahme der Vesikel in die Rezipientenzellen eingeschleust und können dort die Expression von spezifischen Ziel-mRNAs post-transkriptionell steuern [147, 148]. Dieser Mechanismus wurde sowohl in kardiovaskulären als auch in renalen Systemen bereits experimentell nachgewiesen [148, 149]. Auf diese Weise ist es also möglich, dass Donor- und Rezipientenzellen aber auch unterschiedliche Gewebe oder Organe über den Transfer von miRNAs kommunizieren bzw. so die Expression von Zielgenen in anderen Organen beeinflussen. Das kardiovaskuläre und das renale System stehen besonders unter pathophysiologischen Bedingungen in einem engen Zusammenhang zueinander [78, 81]. Diese enge pathophysiologische Verknüpfung wurde unter dem Begriff „kardiorenales Syndrom“ zusammengefasst [45]. Insbesondere im Rahmen dieses engen Zusammenwirkens wird vermutet, dass zirkulierende miRNAs an der pathophysiologisch-relevanten Interaktion zwischen beiden Systemen beteiligt sind [150]. Wie zuvor erörtert, wurden pathophysiologische Einflüsse für miR-19a, miR-126 und miR-497 sowohl im kardiovaskulären als auch im renalen System beschrieben [139, 141-145]. Für miR-29b wurde bislang nur eine pathophysiologische Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen belegt [140]. Daher untersuchten wir abschließend die pathophysiologische Relevanz von miR-29b im renalen System.

Podozyten sind in der Niere von großer Bedeutung für den Erhalt der Struktur des Glomerulums sowie für dessen essenzielle Barriere- und Filtrations-Funktion [67]. Strukturelle Veränderungen sowie der funktionelle Verlust von Podozyten tragen maßgeblich zur Entstehung und Pathogenese verschiedener Nierenerkrankungen bei, wie der „*Minimal-Change*“-Glomerulonephritis oder der häufig auftretenden DN [93, 151, 152].

Das Membranglykoprotein PDPN wird in verschiedensten Zellen und Geweben gebildet, wie in lymphatischen Endothelzellen, in glomerulären Epithelzellen (Podozyten) sowie in verschiedenen Tumorgeweben [60, 71, 153-155]. PDPN spielt u.a. eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Lymphsystems aber auch bei krebsassoziierten Prozessen, wie der Krebszellmigration und Tumordinvasion

[156, 157]. Die physiologische Bedeutung von PDPN in der Niere war bislang unklar. Verschiedene Studien in Tiermodellen deuteten aber darauf hin, dass PDPN eine pathophysiologische Rolle bei unterschiedlichen Nierenerkrankungen spielen könnte [60, 71, 73, 74]. So zeigten Breiteneder-Geleff *et al.* schon 1997 in einem „Minimal-Change“-Glomerulonephritis-Rattenmodell, dass die Expression von PDPN in den Podozyten dieser Ratten signifikant verringert war im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen [73]. Ähnliche Beobachtungen machten auch Matsui und Kollegen ein Jahr später in einem Tiermodell für eine durch Puromyzin induzierte Nephrose [60]. In diesen Versuchen führte die PDPN-Inhibition mittels Antikörpern zu einem strukturellen und funktionellen Verlust der betroffenen Rattenpodozyten. Die zu beobachtenden Folgen waren u.a. die Verschmelzung der Fußfortsätze der Podozyten („*foot process effacement*“) sowie die Ausbildung einer reversiblen Proteinurie im Rattenmodell [60]. Ferner zeigten *in vivo* Versuche in spontan hypertensiven Munich Wistar Frömter (MWF)-Ratten, welche eine altersbedingte Albuminurie ausbilden, dass der Funktionsverlust der glomerulären Podozyten und damit die entstehende Albuminurie mit einem selektiven Verlust von PDPN in den betroffenen Glomeruli bzw. den Podozyten assoziiert war [74]. Zusammen deuteten diese Beobachtungen darauf hin, dass PDPN von pathophysiologischer Bedeutung bei verschiedener Nierenerkrankungen ist. Welche funktionelle Rolle PDPN unter diesen Bedingungen der Niere zukommt, war aber weiter unbekannt.

Im Rahmen unserer Studie konnten wir zum ersten Mal demonstrieren, dass PDPN ein überlebensfördernder Faktor in humanen Podozyten unter pathophysiologisch-relevanten Bedingungen ist [158]. AngII führte in unseren Versuchen zu einer erhöhten Apoptoserate und einer verringerten Zellviabilität der Podozyten [158]. Dieser pro-apoptotische Einfluss von AngII in Podozyten sowie in anderen Zellen und Geweben wird durch die Ergebnisse diverser Arbeiten anderer Gruppen belegt [64, 65, 159] und spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener renaler Erkrankungen, wie der DN und der CKD [62, 160]. Mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen konnten wir erstmalig einen funktionellen Einfluss von PDPN auf zelluläre Funktionen von Podozyten, wie das Zellüberleben und das Apoptoseverhalten, nachweisen [158]. Die dabei erhobenen Daten belegten, dass die siRNA-vermittelte Hemmung von PDPN in AngII-stimulierten Zellen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen zu einer signifikant erhöhten Zellapoptose

sowie einer verringerten Podozytenviabilität führte [158]. In ruhenden Zellen hingegen war keine Veränderung dieser Zellfunktionen durch die siPDPN-Transfektion zu detektieren [158]. Diese Ergebnisse werden durch die Beobachtungen anderer Studien untermauert [153, 161, 162]. In Übereinstimmung mit unseren Daten demonstrierten Rahadiani *et al.* 2010, dass die Hemmung von PDPN in ösophagialen Plattenepithelkarzinomzellen mittels spezifischer siRNAs mit einer gesteigerten Apoptoserate nach der Stimulation dieser Zellen mit Topotecan assoziiert war [161]. Des Weiteren führte die PDPN-Überexpression in diesen Zellen zu einer gesteigerten Zellviabilität im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen [161]. Einige Jahre später zeigten Yamaki und Kollegen, dass die siRNA-vermittelte Herunterregulation der PDPN-Expression ebenso in humanen Mesothelzellen Zellapoptose induzierte [162]. Umgekehrt war die Überexpression von PDPN in diesen Zellen mit einer erhöhten Resistenz gegen eine durch Cisplatin induzierte Apoptose verbunden [162]. Cortez *et al.* kamen durch ihre Versuche in Glioblastomzellen zu ähnlichen Resultaten [153]. Sie fanden heraus, dass die posttranskriptionelle Expressionshemmung von PDPN durch miR-29b in verschiedenen Glioblastomzelllinien (U87, U251) die Apoptoserate dieser Zellen signifikant steigerte [153]. Einige Studien deuten allerdings darauf hin, dass dieser anti-apoptotische Effekt von PDPN nicht in allen Zellen oder experimentellen Systemen gleichermaßen detektierbar ist [163, 164]. So konnten Rudzinska und Kollegen 2014 keine signifikante Wirkung der siRNA-vermittelten Herunterregulation von PDPN auf das Apoptoseverhalten von schilddrüsenkrebsstämmigen Zellen nachweisen [164]. Des Weiteren zeigten Song *et al.*, dass eine vermehrte PDPN-Expression mit einer verstärkten durch Lipopolysaccharide induzierten Apoptose in neuronalen Zellen assoziiert war [163]. Diese Unterschiede in den beobachteten Effekten von PDPN auf das Apoptoseverhalten können mannigfaltige Gründe haben. Zum einen können zelltyp- bzw. gewebsspezifische Unterschiede diese Diskrepanz bedingen, wie die Nutzung neuronaler [163], krebsstämmiger [161] oder auch renaler Zellsysteme [158] in den verschiedenen Studien. All diese experimentellen Zellsysteme besitzen u.a. eine unterschiedliche Ausstattung an Enzymen sowie Rezeptoren und unterscheiden sich ferner hinsichtlich ihrer spezifischen metabolischen bzw. Zellteilungs-Aktivitäten. Des Weiteren können auch Unterschiede in den verwendeten experimentellen Systemen und dem methodischen Vorgehen Gründe

dafür sein. So wurde in einigen Studien der Einfluss von siPDPN in ruhenden Zellen untersucht [164], während in anderen Versuchen der Einfluss von siPDPN auf die stimulanzierte Apoptose charakterisiert wurde [158, 161]. Ferner wurden auch unterschiedliche Stimulanzen zur Induktion der Apoptose verwendet, welche ihre spezifischen Effekte über vollkommen unterschiedliche Signalwege vermitteln [158, 161, 163]. So induziert Topotecan Zellaoptose über eine irreversible Inhibition von Top1 und die Fragmentierung der DNA [43, 161], AngII induziert u.a. das RAAS [59, 62, 158], während Lipopolysaccharide z.B. über „*Toll-like*“-Rezeptoren und pro-apoptotische p38-Signaltransduktion zur Apoptoseinduktion führen [151, 163]. Methodische Unterschiede gab es auch in der Form der PDPN-Hemmung, wie der Nutzung post-transkriptioneller inhibitorischer miRNAs [153], der Verwendung von siRNAs, welche mittels Lipofektion in die entsprechenden Zellen eingebracht wurden [158, 162] oder die Herstellung stabiler siPDPN-bildender Transfektanten [161]. Über diese experimentellen und methodischen Unterschiede lassen sich die zuvor dargestellten Beobachtungen und möglichen Unterschiede durchaus erklären.

Neben der funktionellen Charakterisierung von PDPN in Podozyten untersuchten wir auch die Steuerung der PDPN Expression. In diesem Zusammenhang demonstrierten wir erstmalig, dass die Expression dieses Membranglykoproteins in Podozyten durch die Stimulation mit AngII in konzentrationsabhängiger Weise verringert wurde [158]. Dieses Ergebnis wird durch die Beobachtungen von Mii *et al.* in einem Rattenmodell zur Glomerulonephritis untermauert [165]. In dieser Studie beschreiben die Autoren, dass die PDPN-Expression in Glomerulonephritis-Ratten signifikant verringert war [165]. Die pharmakologische Blockade des AngII-Rezeptors in diesen Tieren führte zu einer deutlichen Erhöhung der PDPN-Expression im Glomerulum. Dies ging mit einer signifikanten Verbesserung des Gesundheitszustandes der Ratten einher [165]. Diese Daten deuteten zusammen mit unseren Ergebnissen darauf hin, dass AngII-induzierte Signaltransduktionsmechanismen die PDPN-Expression in glomerulären Zellen direkt beeinflussen.

In unseren Versuchen fanden wir ferner heraus, dass die Stimulation der Podozyten mit AngII, einhergehend mit der Verringerung der PDPN-Bildung, die Expression von miR-29b in konzentrationsabhängiger Form induzierte [158].

Dieser Befund wird durch die Untersuchungen von Jeppesen *et al.* bestätigt, die zeigten, dass AngII u.a. die Expression von miR-29b in nierenstämmigen humanen tubulären Epithelzellen (HEK293) induziert [166]. *In silico* durchgeführte Datenbankanalysen wiesen ferner darauf hin, dass diese miRNA an Sequenzmotive innerhalb der regulatorischen 3'UTR der PDPN-mRNA binden kann [158]. Mittels funktioneller Untersuchungen waren wir abschließend in der Lage zu demonstrieren, dass miR-29b die Expression von PDPN in humanen Podozyten auf post-transkriptioneller Ebene hemmt [158]. Dies wurde über die direkte Bindung dieser miRNA und die 3'UTR der PDPN-mRNA vermittelt [158]. Die Untersuchungen von Cortez und Kollegen belegen unsere Daten [153]. In ihren Experimenten fanden sie heraus, dass neben miR-125 auch miR-29b die PDPN-Bildung in glioblastomstämmigen Krebszellen hemmt [153]. Ferner zeigten sie in Übereinstimmung mit unseren Resultaten, dass die Hemmung der PDPN-Expression über die Bindung dieser miRNAs an die PDPN-3'UTR gesteuert wird [153].

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass miR-29b die PDPN-Expression in Podozyten auf post-transkriptioneller Ebene steuert. Ferner konnte im Rahmen dieser Studie erstmalig eine funktionelle Bedeutung von PDPN im renalen System dargelegt werden. Wir zeigten, dass PDPN unter pathophysiologisch-relevanten Bedingungen, wie dem Einfluss von AngII, als ein anti-apoptotischer und überlebensfördernder Faktor in humanen Podozyten wirkt. Dies führt zu der These, dass die post-transkriptionelle Steuerung der PDPN-Bildung über miR-29b die biologische Funktion dieses Proteins in der Niere steuern kann. Dies belegt, dass miR-29b nicht nur im kardiovaskulären System, sondern ebenso in der Niere potentiell Einfluss auf (patho-)physiologisch-relevante Prozesse nehmen kann. Diese Theorie muss allerdings erst in geeigneten *in vivo*-Modellen überprüft werden.

5. Zusammenfassung

Post-transkriptionelle Mechanismen der Expressionssteuerung, wie alternatives Spleißen und miRNA-vermittelte Kontrollmechanismen sind von essenzieller Bedeutung für die Diversifizierung und Anpassungsfähigkeit des Proteoms bei sich ändernden Bedingungen [8, 27]. In diesem Zusammenhang spielen sie eine bedeutende Rolle bei der Steuerung nahezu aller biologischer Funktionen im menschlichen Organismus. An der Kontrolle dieser Regulationsmechanismen sind verschiedene Faktoren beteiligt [4, 23]. Die Steuerung sowie die Veränderung dieser Prozesse spielt ebenfalls im kardiovaskulären System wie auch in der Niere eine bedeutende Rolle, sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen [4, 25]. Kardiovaskuläre und renale Funktionen, wie die Regulation der Thrombogenität, der Angiogenese und der glomerulären Filtration aber auch das Zellüberleben, werden über die Expression von Proteinen und deren Isoformen, wie TF, Cyr61, Itg- α v oder PDPN, gesteuert [2, 55, 157]. Ferner sind das Herz und die Niere unter physiologischen und besonders unter pathophysiologischen Bedingungen funktionell eng miteinander verknüpft [78]. Daher liegt der Gedanke nahe, dass grundlegende Prozesse, wie die post-transkriptionellen Regulationsmechanismen der Genexpression, in beiden Systemen von großer funktioneller Bedeutung sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Steuerung alternativer Spleißprozesse wie auch miRNA-vermittelter Regulationsmechanismen sowie deren Einfluss auf kardiovaskuläre und renale Funktionen unter (patho-)physiologisch-relevanten Bedingungen untersucht.

Der erste Teil dieser Habilitationsarbeit befasste sich mit dem Einfluss alternativer Spleißprozesse im kardiovaskulären System. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass neben den Clks und Top1 auch die PI3K/Akt-Achse an der Regulation des alternativen TF-Spleißens und der Bildung der asTF-Isoform in kardiovaskulären Zellen beteiligt ist [10, 106]. Dies wurde über die Phosphorylierung der SR-Proteine: SRp75, SRp55 und SF2/ASF vermittelt, welche das alternative Spleißen von TF direkt steuern. Da die Funktion der asTF-Isoform bislang weitgehend unbekannt war, charakterisierten wir im nächsten Schritt die funktionelle Bedeutung dieser Isoform. Die von uns erhobenen Daten wiesen darauf hin, dass asTF im kardiovaskulären System sowohl eine pro-angiogene als

auch eine proliferationsfördernde Funktion ausübt [112]. Dieser Befund wurde durch Studien anderer Arbeitsgruppen in Endothel- und Lungenkarzinomzellen untermauert [12, 42]. Im Zusammenhang damit konnten wir auch erstmalig einen potentiellen Mechanismus für diese asTF-induzierten Funktionen benennen, welcher die Aktivierung der Erk1/2- und p38-vermittelten Signaltransduktion und die Expressionserhöhung pro-angiogener Faktoren, wie VEGF und FGF2, einschließt. Ferner zeigten unsere Daten zum ersten Mal, dass die Kontrolle alternativer Spleißprozesse über SR-Proteinkinase auch die Isoformexpression des Chemokins Cyr61 und seines Rezeptors Itg- α v beeinflusste [120]. Über die durch Clk- und Top1 vermittelte Regulation der Isoformexpression beider Faktoren wurden endotheliale Funktionen, wie die Proliferation von Endothelzellen sowie ihr pro-angiogenes Potential, signifikant verändert. Zusammen lieferten diese Resultate neue Einblicke in die Steuerung und funktionelle Bedeutung des alternativen Spleißens im kardiovaskulären System.

Der zweite Abschnitt dieser Habilitationsarbeit beschäftigte sich mit der Rolle miRNA-vermittelter, post-transkriptioneller Regulationsmechanismen bei der Steuerung kardiovaskulärer und renaler Funktionen. In diesem Zusammenhang lieferten unsere Versuche neue Einblicke in die miRNA-vermittelte Expressionskontrolle der TF-Isoformen, asTF und fITF im Endothel, sowie für die Steuerung der PDPN-Expression und deren funktioneller Rolle im renalen Raum [133, 158].

In der ersten zugrunde liegenden Arbeit wurde gezeigt, dass miR-19a die Expression beider TF-Isoformen verringert [133]. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse von Zhang *et al.* bestätigt, welche ebenfalls einen regulatorischen Einfluss von miR-19 auf die Expression von Gesamt-TF in Brustkrebszellen nachweisen konnten [88]. Ferner waren wir erstmals in der Lage, die Beteiligung einer weiteren miRNA, nämlich miR-126, bei der Hemmung der Expression von asTF und fITF im Endothel zu demonstrieren [133]. Des Weiteren zeigten unsere Daten erstmals einen funktionellen Einfluss dieser post-transkriptionellen Regulationsprozesse. Die miRNA-vermittelte Verringerung von asTF und fITF führten zu einer Reduktion der endothelialen Thrombogenität, was bedeutenden Einfluss auf verschiedene endotheliale Funktionen haben kann, wie die Kontrolle der Gefäßwandhämostase oder der Blutgerinnung [133].

Die Ergebnisse der zweiten zugrunde liegenden Studie zeigen, dass miR-29b die Expression des Membranglykoprotein PDPN in Podozyten reguliert [158]. Dies wird durch die Arbeiten einer anderen Gruppe in Glioblastomzellen bestätigt [153]. Ferner führt die Verringerung der PDPN-Expression zu einer erhöhten Apoptoserate und reduzierten Viabilität von Podozyten unter AngII-Stimulation [158]. Dadurch konnten wir erstmals eine anti-apoptotische bzw. überlebensfördernde Funktion von PDPN in Podozyten belegen sowie die regulatorische Rolle von miR-29b dabei beschreiben. Die Ergebnisse dieser Versuche deuten daher auf eine wichtige funktionelle Bedeutung der miRNA-vermittelten Expressionsregulation in kardiovaskulären und renalen Zellen hin.

Zusammenfassend zeigen die zuvor beschriebenen Ergebnisse, dass alternatives Spleißen und miRNA-vermittelte Prozesse einen bedeutenden post-transkriptionellen Einfluss auf die Bildung verschiedener Faktoren, wie asTF, flTF oder PDPN, in kardiovaskulären bzw. glomerulären Zellen besitzen. Darüber werden essenzielle kardiovaskuläre und renale Funktionen, wie die Zellproliferation, die Thrombogenität, die Angiogenese sowie das Zellüberleben unter normalen und pathophysiologisch-relevanten Bedingungen entscheidend beeinflusst. Dadurch bieten diese Prozesse potentielle Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapieoptionen zur Behandlung von kardiovaskulären und renalen Erkrankungen.

6. Literaturverzeichnis

1. Falus, A., *Immunogenomics and Human Disease*. 2006: Wiley.
2. Eisenreich, A. and U. Rauch, *Regulation and differential role of the tissue factor isoforms in cardiovascular biology*. Trends Cardiovasc Med, 2010. **20**(6): p. 199-203.
3. Scherrer, K., et al., *On pre-messenger RNA and transcriptions. A review*. Mol Biol Rep, 1979. **5**(1-2): p. 5-28.
4. Eisenreich, A., *Regulation of vascular function on posttranscriptional level*. Thrombosis, 2013. **2013**: p. 948765.
5. Knowles, D.G. and A. McLysaght, *Recent de novo origin of human protein-coding genes*. Genome Res, 2009. **19**(10): p. 1752-9.
6. Keren, H., G. Lev-Maor, and G. Ast, *Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(5): p. 345-55.
7. Ogorodnikov, A., Y. Kargapolova, and S. Danckwardt, *Processing and transcriptome expansion at the mRNA 3' end in health and disease: finding the right end*. Pflugers Arch, 2016. **468**(6): p. 993-1012.
8. Stamm, S., et al., *Function of alternative splicing*. Gene, 2005. **344**: p. 1-20.
9. Wang, G.S. and T.A. Cooper, *Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(10): p. 749-61.
10. Eisenreich, A., et al., *Cdc2-like kinases and DNA topoisomerase I regulate alternative splicing of tissue factor in human endothelial cells*. Circ Res, 2009. **104**(5): p. 589-99.
11. Eisenreich, A., et al., *Effects of the Cdc2-like kinase-family and DNA topoisomerase I on the alternative splicing of eNOS in TNF-alpha-stimulated human endothelial cells*. Biol Chem, 2008. **389**(10): p. 1333-8.
12. Eisenreich, A., et al., *Regulation of pro-angiogenic tissue factor expression in hypoxia-induced human lung cancer cells*. Oncol Rep, 2013. **30**(1): p. 462-70.
13. Sena, J.A., et al., *Hypoxia regulates alternative splicing of HIF and non-HIF target genes*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(9): p. 1233-43.
14. Chandradas, S., et al., *Antagonistic roles of four SR proteins in the biosynthesis of alternatively spliced tissue factor transcripts in monocytic cells*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(1): p. 147-52.
15. Tardos, J.G., et al., *SR proteins ASF/SF2 and SRp55 participate in tissue factor biosynthesis in human monocytic cells*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(5): p. 877-84.
16. Blaustein, M., et al., *Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(12): p. 1037-44.
17. Stevens, M. and S. Oltean, *Alternative Splicing in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(6): p. 1596-603.
18. van den Hoogenhof, M.M., Y.M. Pinto, and E.E. Creemers, *RNA Splicing: Regulation and Dysregulation in the Heart*. Circ Res, 2016. **118**(3): p. 454-68.
19. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
20. Berezikov, E., et al., *Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes*. Cell, 2005. **120**(1): p. 21-4.
21. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.
22. Iwama, H., *Coordinated networks of microRNAs and transcription factors with evolutionary perspectives*. Adv Exp Med Biol, 2013. **774**: p. 169-87.
23. Eisenreich, A. and U. Leppert, *The impact of microRNAs on the regulation of tissue factor biology*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(3): p. 128-32.
24. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
25. Trionfani, P., A. Benigni, and G. Remuzzi, *MicroRNAs in kidney physiology and disease*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(1): p. 23-33.

26. Zhao, Y., et al., *Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2*. Cell, 2007. **129**(2): p. 303-17.
27. Yan, S. and K. Jiao, *Functions of miRNAs during Mammalian Heart Development*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(5).
28. Li, Z., et al., *miR-199-sponge transgenic mice develop physiological cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 2016. **110**(2): p. 258-67.
29. Marrone, A.K., et al., *MicroRNA-17~92 is required for nephrogenesis and renal function*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(7): p. 1440-52.
30. Wu, J., et al., *MicroRNA-30 family members regulate calcium/calcineurin signaling in podocytes*. J Clin Invest, 2015. **125**(11): p. 4091-106.
31. Cao, J., et al., *MicroRNA-146a and -21 cooperate to regulate vascular smooth muscle cell proliferation via modulation of the Notch signaling pathway*. Mol Med Rep, 2015. **11**(4): p. 2889-95.
32. Zacchigna, S. and M. Giacca, *Extra- and intracellular factors regulating cardiomyocyte proliferation in postnatal life*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 312-20.
33. van Rooij, E., et al., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13027-32.
34. Wijnen, W.J., et al., *Cardiomyocyte-specific miRNA-30c over-expression causes dilated cardiomyopathy*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96290.
35. Isserlin, R., et al., *Systems analysis reveals down-regulation of a network of pro-survival miRNAs drives the apoptotic response in dilated cardiomyopathy*. Mol Biosyst, 2015. **11**(1): p. 239-51.
36. Denby, L. and A.H. Baker, *Targeting non-coding RNA for the therapy of renal disease*. Curr Opin Pharmacol, 2016. **27**: p. 70-7.
37. Wang, X.H., et al., *Decreased miR-29 suppresses myogenesis in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(11): p. 2068-76.
38. Rudnicki, M., et al., *Renal microRNA- and RNA-profiles in progressive chronic kidney disease*. Eur J Clin Invest, 2016. **46**(3): p. 213-26.
39. Hirschfeld, M., et al., *Alternative splicing of Cyr61 is regulated by hypoxia and significantly changed in breast cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(5): p. 2082-90.
40. Rother, M., et al., *Matricellular signaling molecule CCN1 attenuates experimental autoimmune myocarditis by acting as a novel immune cell migration modulator*. Circulation, 2010. **122**(25): p. 2688-98.
41. Chen, N., et al., *Identification of a novel integrin alphavbeta3 binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 44166-76.
42. van den Berg, Y.W., et al., *Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19497-502.
43. Boltzen, U., et al., *Alternatively spliced tissue factor and full-length tissue factor protect cardiomyocytes against TNF-alpha-induced apoptosis*. J Mol Cell Cardiol, 2012. **52**(5): p. 1056-65.
44. Antoniak, S., et al., *Regulation of cardiomyocyte full-length tissue factor expression and microparticle release under inflammatory conditions in vitro*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(5): p. 871-8.
45. Ronco, C., et al., *Cardiorenal syndrome*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(19): p. 1527-39.
46. Damman, K. and J.M. Testani, *The kidney in heart failure: an update*. Eur Heart J, 2015. **36**(23): p. 1437-44.
47. Pries, A.R. and W.M. Kuebler, *Normal endothelium*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 1): p. 1-40.
48. Mackman, N., *Regulation of the tissue factor gene*. FASEB J, 1995. **9**(10): p. 883-9.
49. Pawlinski, R., et al., *Role of cardiac myocyte tissue factor in heart hemostasis*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(8): p. 1693-700.

50. Davis, D.R. and J.H. Erlich, *Cardiac tissue factor: roles in physiology and fibrosis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008. **35**(3): p. 342-8.
51. Bogdanov, V.Y., et al., *Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein*. Nat Med, 2003. **9**(4): p. 458-62.
52. Yu, J.L. and J.W. Rak, *Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(11): p. 2065-7.
53. Hobbs, J.E., et al., *Alternatively spliced human tissue factor promotes tumor growth and angiogenesis in a pancreatic cancer tumor model*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 2**: p. S13-21.
54. McGilvray, I.D., et al., *VLA-4 integrin cross-linking on human monocytic THP-1 cells induces tissue factor expression by a mechanism involving mitogen-activated protein kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 10287-94.
55. Lau, L.F., *CCN1/CYR61: the very model of a modern matricellular protein*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(19): p. 3149-63.
56. Leu, S.J., S.C. Lam, and L.F. Lau, *Pro-angiogenic activities of CYR61 (CCN1) mediated through integrins alphavbeta3 and alpha6beta1 in human umbilical vein endothelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46248-55.
57. Lobel, M., et al., *CCN1: a novel inflammation-regulated biphasic immune cell migration modulator*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(18): p. 3101-13.
58. Yubero, N., et al., *Two cDNAs coding for the porcine CD51 (alphav) integrin subunit: cloning, expression analysis, adhesion assays and chromosomal localization*. Gene, 2011. **481**(1): p. 29-40.
59. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 11-34.
60. Matsui, K., S. Breiteneder-Geleff, and D. Kerjaschki, *Epitope-specific antibodies to the 43-kD glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(11): p. 2013-26.
61. Nguyen Dinh Cat, A. and R.M. Touyz, *Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms*. Curr Hypertens Rep, 2011. **13**(2): p. 122-8.
62. Rahimi, Z., *The Role of Renin Angiotensin Aldosterone System Genes in Diabetic Nephropathy*. Can J Diabetes, 2016. **40**(2): p. 178-83.
63. Khan, N.S., et al., *Cytosolic phospholipase A2alpha is critical for angiotensin II-induced hypertension and associated cardiovascular pathophysiology*. Hypertension, 2015. **65**(4): p. 784-92.
64. Snijder, P.M., et al., *Sodium thiosulfate attenuates angiotensin II-induced hypertension, proteinuria and renal damage*. Nitric Oxide, 2014. **42**: p. 87-98.
65. Liu, Y., et al., *IQGAP1 mediates angiotensin II-induced apoptosis of podocytes via the ERK1/2 MAPK signaling pathway*. Am J Nephrol, 2013. **38**(5): p. 430-44.
66. Yu, S.Y., R. Qi, and H. Zhao, *Losartan reverses glomerular podocytes injury induced by AngII via stabilizing the expression of GLUT1*. Mol Biol Rep, 2013. **40**(11): p. 6295-301.
67. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 253-307.
68. Zhou, G., et al., *Valsartan slows the progression of diabetic nephropathy in db/db mice via a reduction in podocyte injury, and renal oxidative stress and inflammation*. Clin Sci (Lond), 2014. **126**(10): p. 707-20.
69. Matsui, K., et al., *Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14 Suppl 1**: p. 9-11.
70. Patrakka, J. and K. Tryggvason, *Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter*. Trends Mol Med, 2007. **13**(9): p. 396-403.
71. Ijpeelaar, D.H., et al., *Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Fröster rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(4): p. F758-67.

72. Yano, Y., et al., *New-onset hypertension and risk for chronic kidney disease in the Japanese general population*. J Hypertens, 2014. **32**(12): p. 2371-7; discussion 2377.
73. Breiteneder-Geleff, S., et al., *Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 1141-52.
74. Koop, K., et al., *Selective loss of podoplanin protein expression accompanies proteinuria and precedes alterations in podocyte morphology in a spontaneous proteinuric rat model*. Am J Pathol, 2008. **173**(2): p. 315-26.
75. Alscher, M.D., *Heart and kidney*. Der Kardiologe, 2009. **3**(6): p. 489-498.
76. Bock, J.S. and S.S. Gottlieb, *Cardiorenal syndrome: new perspectives*. Circulation, 2010. **121**(23): p. 2592-600.
77. Daugirdas, J.T., *Handbook of Chronic Kidney Disease Management*. 2011: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health.
78. Colombo, P.C., et al., *Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome*. Heart Fail Rev, 2012. **17**(2): p. 177-90.
79. Kingma, J.G., Jr., D. Simard, and J.R. Rouleau, *Renocardiac syndromes: physiopathology and treatment stratagems*. Can J Kidney Health Dis, 2015. **2**: p. 41.
80. Ronco, C., A.A. House, and M. Haapio, *Cardiorenal and renocardiac syndromes: the need for a comprehensive classification and consensus*. Nat Clin Pract Nephrol, 2008. **4**(6): p. 310-1.
81. Shiba, N. and H. Shimokawa, *Chronic kidney disease and heart failure--Bidirectional close link and common therapeutic goal*. J Cardiol, 2011. **57**(1): p. 8-17.
82. Mackman, N., *Regulation of the tissue factor gene*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 747-54.
83. Naldini, A. and F. Carraro, *Role of inflammatory mediators in angiogenesis*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(1): p. 3-8.
84. Arnaoutova, I. and H.K. Kleinman, *In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract*. Nat Protoc, 2010. **5**(4): p. 628-35.
85. McNeill, B., et al., *Collagen matrix-induced expression of integrin alphaVbeta3 in circulating angiogenic cells can be targeted by matricellular protein CCN1 to enhance their function*. FASEB J, 2015. **29**(4): p. 1198-207.
86. Mackman, N., *Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 104-7.
87. Shomron, N., D. Golan, and E. Hornstein, *An evolutionary perspective of animal microRNAs and their targets*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 594738.
88. Zhang, X., et al., *MicroRNA-19 (miR-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(2): p. 1429-35.
89. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
90. Latronico, M.V., et al., *Heart failure: targeting transcriptional and post-transcriptional control mechanisms of hypertrophy for treatment*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(9): p. 1643-8.
91. Rana, I., et al., *MicroRNAs mediate the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in acute kidney injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **309**(11): p. F943-54.
92. Kriegel, A.J., D. Mladinov, and M. Liang, *Translational study of microRNAs and its application in kidney disease and hypertension research*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(10): p. 439-47.
93. Lemley, K.V., *Glomerular pathology and the progression of chronic kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **310**(11): p. F1385-8.
94. Du, Y., et al., *Annexin A7 modulates BAG4 and BAG4-binding proteins in mitochondrial apoptosis*. Biomed Pharmacother, 2015. **74**: p. 30-4.
95. Amaravadi, R. and C.B. Thompson, *The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2618-24.
96. Ahamed, J., et al., *Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 13932-7.

97. Srinivasan, R., et al., *Splice variants of tissue factor promote monocyte-endothelial interactions by triggering the expression of cell adhesion molecules via integrin-mediated signaling*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(10): p. 2087-96.
98. Versteeg, H.H., et al., *TF:FVIIa-specific activation of CREB upregulates proapoptotic proteins via protease-activated receptor-2*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(9): p. 1550-7.
99. Leppert, U. and A. Eisenreich, *The role of tissue factor isoforms in cancer biology*. Int J Cancer, 2015. **137**(3): p. 497-503.
100. Eisenreich, A., J. Bolbrinker, and U. Leppert, *Tissue Factor: A Conventional or Alternative Target in Cancer Therapy*. Clin Chem, 2016. **62**(4): p. 563-70.
101. Shepard, P.J. and K.J. Hertel, *The SR protein family*. Genome Biol, 2009. **10**(10): p. 242.
102. Sanford, J.R., et al., *Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(42): p. 15042-7.
103. Prasad, J., et al., *The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 6991-7000.
104. Ngo, J.C., et al., *Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2*. Mol Cell, 2005. **20**(1): p. 77-89.
105. Rossi, F., et al., *Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I*. Nature, 1996. **381**(6577): p. 80-2.
106. Eisenreich, A., et al., *Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells*. Circ J, 2009. **73**(9): p. 1746-52.
107. Blaustein, M., et al., *Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21029-37.
108. Patel, N.A., et al., *Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase Cbeta11 alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40*. J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 14302-9.
109. Parry, G.C. and N. Mackman, *Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 612-21.
110. Han, J., et al., *SR proteins induce alternative exon skipping through their activities on the flanking constitutive exons*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(4): p. 793-802.
111. Censarek, P., et al., *Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant*. Thromb Haemost, 2007. **97**(1): p. 11-4.
112. Eisenreich, A., et al., *Overexpression of alternatively spliced tissue factor induces the pro-angiogenic properties of murine cardiomyocytic HL-1 cells*. Circ J, 2011. **75**(5): p. 1235-42.
113. Kocaturk, B., et al., *Alternatively spliced tissue factor synergizes with the estrogen receptor pathway in promoting breast cancer progression*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(9): p. 1683-93.
114. Kocaturk, B., et al., *Alternatively spliced tissue factor promotes breast cancer growth in a beta1 integrin-dependent manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(28): p. 11517-22.
115. Jaipersad, A.S., et al., *The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(1): p. 1-11.
116. Lahat, N., et al., *Reduced TIMP-2 in hypoxia enhances angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **300**(3): p. C557-66.
117. Capoccia, B.J., R.M. Shepherd, and D.C. Link, *G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism*. Blood, 2006. **108**(7): p. 2438-45.
118. Sapharikas, E., et al., *Fucoidan Stimulates Monocyte Migration via ERK/p38 Signaling Pathways and MMP9 Secretion*. Mar Drugs, 2015. **13**(7): p. 4156-70.
119. Pan, X.Y., et al., *Hirudin promotes angiogenesis by modulating the cross-talk between p38 MAPK and ERK in rat ischemic skin flap tissue*. Tissue Cell, 2015. **47**(3): p. 301-10.
120. Gauck, S., et al., *Modulation of the isoform expression of Cyr61 and Integrin-av in human microvascular endothelial cells*. Cardiovascular System, 2013. **1**(1).

121. Koziol, A., et al., *The protease MT1-MMP drives a combinatorial proteolytic program in activated endothelial cells*. FASEB J, 2012. **26**(11): p. 4481-94.
122. Zhang, H., S.M. Tan, and J. Lu, *cDNA cloning reveals two mouse beta5 integrin transcripts distinct in cytoplasmic domains as a result of alternative splicing*. Biochem J, 1998. **331 (Pt 2)**: p. 631-7.
123. Fedorov, O., et al., *Specific CLK inhibitors from a novel chemotype for regulation of alternative splicing*. Chem Biol, 2011. **18**(1): p. 67-76.
124. Li, P., et al., *Clk/STY (cdc2-like kinase 1) and Akt regulate alternative splicing and adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53268.
125. Soret, J., et al., *Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in Mammalian cells lacking topoisomerase I*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8203-11.
126. Hagiwara, M., *Alternative splicing: a new drug target of the post-genome era*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1754**(1-2): p. 324-31.
127. Solier, S., et al., *Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(1): p. 53-61.
128. Mercatante, D.R., et al., *Modification of alternative splicing of Bcl-x pre-mRNA in prostate and breast cancer cells. analysis of apoptosis and cell death*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16411-7.
129. Marcel, V., et al., *Modulation of p53beta and p53gamma expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response*. Cell Death Differ, 2014. **21**(9): p. 1377-87.
130. Liu, Y., et al., *Phosphorylation of the alternative mRNA splicing factor 45 (SPF45) by Clk1 regulates its splice site utilization, cell migration and invasion*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(9): p. 4949-62.
131. Nowak, D.G., et al., *Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 20): p. 3487-95.
132. Araki, S., et al., *Inhibitors of CLK protein kinases suppress cell growth and induce apoptosis by modulating pre-mRNA splicing*. PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0116929.
133. Eisenreich, A. and U. Rauch, *Regulation of the Tissue Factor Isoform Expression and Thrombogenicity of HMEC-1 by miR-126 and miR-19a*. Cell Biol: Res Ther, 2013. **2**(1).
134. Witkowski, M., et al., *Micro-RNA-126 Reduces the Blood Thrombogenicity in Diabetes Mellitus via Targeting of Tissue Factor*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(6): p. 1263-71.
135. Yu, G., et al., *MicroRNA-19a targets tissue factor to inhibit colon cancer cells migration and invasion*. Mol Cell Biochem, 2013. **380**(1-2): p. 239-47.
136. Li, S., et al., *MicroRNA-19b functions as potential anti-thrombotic protector in patients with unstable angina by targeting tissue factor*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **75**: p. 49-57.
137. D'Asti, E., et al., *Tissue Factor Regulation by miR-520g in Primitive Neuronal Brain Tumor Cells: A Possible Link between Oncomirs and the Vascular Tumor Microenvironment*. Am J Pathol, 2016. **186**(2): p. 446-59.
138. Li, S., et al., *MicroRNA-223 inhibits tissue factor expression in vascular endothelial cells*. Atherosclerosis, 2014. **237**(2): p. 514-20.
139. Li, Z., et al., *High association between human circulating microRNA-497 and acute myocardial infarction*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 931845.
140. Maegdefessel, L., J. Azuma, and P.S. Tsao, *MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(1): p. 1-6.
141. Potus, F., et al., *Downregulation of MicroRNA-126 Contributes to the Failing Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension*. Circulation, 2015. **132**(10): p. 932-43.
142. Zhong, J., et al., *Circulating microRNA-19a as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 20355-64.

143. Xiao, W., et al., *Downregulation of miR-19a exhibits inhibitory effects on metastatic renal cell carcinoma by targeting PIK3CA and inactivating Notch signaling in vitro*. *Oncol Rep*, 2015. **34**(2): p. 739-46.
144. Al-Kafaji, G., et al., *Decreased expression of circulating microRNA-126 in patients with type 2 diabetic nephropathy: A potential blood-based biomarker*. *Exp Ther Med*, 2016. **12**(2): p. 815-822.
145. Zhao, X., et al., *Down-regulation of miR-497 is associated with poor prognosis in renal cancer*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. **8**(1): p. 758-64.
146. Tao, W., et al., *Elevated Circulating hsa-miR-106b, hsa-miR-26a, and hsa-miR-29b in Type 2 Diabetes Mellitus with Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome*. *Gastroenterol Res Pract*, 2016. **2016**: p. 9256209.
147. Lorenzen, J.M., F. Martino, and T. Thum, *Detection and transport mechanisms of circulating microRNAs in neurological, cardiac and kidney diseases*. *Curr Med Chem*, 2013. **20**(29): p. 3623-8.
148. Bitzer, M., I.Z. Ben-Dov, and T. Thum, *Microparticles and microRNAs of endothelial progenitor cells ameliorate acute kidney injury*. *Kidney Int*, 2012. **82**(4): p. 375-7.
149. Jansen, F., et al., *Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism*. *J Cell Mol Med*, 2015. **19**(9): p. 2202-14.
150. Clementi, A., et al., *Advances in the pathogenesis of cardiorenal syndrome type 3*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 148082.
151. Saurus, P., et al., *Podocyte apoptosis is prevented by blocking the Toll-like receptor pathway*. *Cell Death Dis*, 2015. **6**: p. e1752.
152. Srivastava, T., et al., *LPS and PAN-induced podocyte injury in an in vitro model of minimal change disease: changes in TLR profile*. *J Cell Commun Signal*, 2013. **7**(1): p. 49-60.
153. Cortez, M.A., et al., *miR-29b and miR-125a regulate podoplanin and suppress invasion in glioblastoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010. **49**(11): p. 981-90.
154. Sun, Q., et al., *Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013. **45**(3): p. 513-20.
155. Pan, Y., W.D. Wang, and T. Yago, *Transcriptional regulation of podoplanin expression by Prox1 in lymphatic endothelial cells*. *Microvasc Res*, 2014. **94**: p. 96-102.
156. Pan, Y. and L. Xia, *Emerging roles of podoplanin in vascular development and homeostasis*. *Front Med*, 2015. **9**(4): p. 421-30.
157. Ugorski, M., P. Dziegiel, and J. Suchanski, *Podoplanin - a small glycoprotein with many faces*. *Am J Cancer Res*, 2016. **6**(2): p. 370-86.
158. Eisenreich, A., et al., *Regulation of podoplanin expression by microRNA-29b associates with its antiapoptotic effect in angiotensin II-induced injury of human podocytes*. *J Hypertens*, 2016. **34**(2): p. 323-31.
159. Huang, Y., et al., *MicroRNA-208a Potentiates Angiotensin II-triggered Cardiac Myoblasts Apoptosis via Inhibiting Nemo-like kinase (NLK)*. *Curr Pharm Des*, 2016.
160. Zhang, W., et al., *Interleukin 6 underlies angiotensin II-induced hypertension and chronic renal damage*. *Hypertension*, 2012. **59**(1): p. 136-44.
161. Rahadiani, N., et al., *Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17**(5): p. 1311-23.
162. Yamaki, E., et al., *Podoplanin overexpression in human mesothelioma cell lines enhances the tumorigenic phenotype*. *Oncol Rep*, 2013. **29**(3): p. 932-40.
163. Song, Y., et al., *Up-regulation of podoplanin involves in neuronal apoptosis in LPS-induced neuroinflammation*. *Cell Mol Neurobiol*, 2014. **34**(6): p. 839-49.
164. Rudzinska, M., et al., *The role of podoplanin in the biology of differentiated thyroid cancers*. *PLoS One*, 2014. **9**(5): p. e96541.
165. Mii, A., et al., *Angiotensin II receptor blockade inhibits acute glomerular injuries with the alteration of receptor expression*. *Lab Invest*, 2009. **89**(2): p. 164-77.

166. Jeppesen, P.L., et al., *Angiotensin II type 1 receptor signalling regulates microRNA differentially in cardiac fibroblasts and myocytes*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(2): p. 394-404.

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz dafür bedanken, dass es mir ermöglicht wurde meine Projekte und diese Habilitationsarbeit am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin durchzuführen.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei allen, die zur erfolgreichen Durchführung meiner wissenschaftlichen Arbeiten sowie deren Publikation beigetragen haben. Neben allen internationalen und nationalen Kooperationspartnern gilt mein Dank natürlich auch allen Mitgliedern des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Im Besonderen danke ich Frau Karen Böhme, Frau Claudia Plum und Frau Petra Pietsch für Ihre Hilfe und methodische Unterstützung sowie für einige anregende Diskussionen und erhellende Momente im Laufe der letzten Jahre. Selbstverständlich möchte ich auch Frau Sabine Wunderlich[†] danken, die für uns alle ein Lichtblick war, an die wir uns gern erinnern werden und die wir sehr vermissen. Insgesamt möchte ich mich für die immer gute und freundschaftliche Atmosphäre im Institut bedanken.

Natürlich gilt mein Dank aber auch meinem privaten Umfeld: Ich danke meiner Lotti, meiner Familie und meinen Freunden dafür, dass sie immer hinter mir standen. Ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, Astrid Eisenreich[†] und meiner Großmutter Hertha Gille[†], die für mich sowohl Anstoß für eine wissenschaftliche Laufbahn als auch der Antrieb für mein Tun waren. Bedingungslos, gaben Sie mir Rückhalt und Unterstützung auf allen Ebenen und zu jeder Zeit. Euch widme ich diese Arbeit. Ihr werdet immer einen Platz in meinem Herzen haben.

8. Erklärung

Erklärung nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité.

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst erarbeitet sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift