

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Gekle

**Interaktion der Signaltransduktion von humanem
Mineralokortikoidrezeptor
und humanem AngiotensinII-Rezeptor Typ I**

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

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

von Robert André Cuno

geboren am 03.07.1975 in Berlin

Gutachter/Gutachterin:

1. Jun. Prof. Dr. Dr. Claudia Großmann
2. Prof. Dr. Jürgen Dittmer
3. Prof. Dr. Morawietz (Dresden)

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 01.07.2014
Öffentliche Verteidigung: 21.01.2015

Referat

In der Pathologie des Herz-Kreislauf-Systems spielen RAAS-Komponenten eine wesentliche Rolle, deren Effektoren letztlich AT1R und MR sind. In der vorliegenden Arbeit werden in einem definierten HEK293-Zellmodell mit transient transfiziertem humanen AT1R und humanem MR Wechselwirkungen in der Signaltransduktion zwischen dem AT1R und dem MR hinsichtlich der genomischen Aktivität am GRE, der Phosphorylierung von ERK1/2 und der kurzfristigen Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration untersucht. Hierzu kamen zur Quantifizierung der ERK1/2-Phosphorylierung SDS-PAGE und Western Blot zum Einsatz. Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration wurden über den Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 registriert. Für die Bestimmung der Aktivität am GRE wurden Reporter-Gen-Assays verwendet.

Bei höheren Konzentrationen (Aldo 10 nM, AngII 100 nM) und kurzer Inkubationszeit (5 min) zeigte sich kein Effekt einer zusätzlichen Gabe von Aldo auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung, bei geringen Konzentrationen (Aldo 100 pM, AngII 1 nM) jedoch eine hemmende Wirkung. Bei einer längeren Inkubation (30 min) war bei den höheren Konzentrationen unter der gleichzeitigen Gabe von Aldo eine geringere ERK1/2-Phosphorylierung zu verzeichnen, jedoch nur in Anwesenheit des MR. Die Beobachtungen im HEK293-Zellmodell stehen im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen an VSMC, wo eine potenzierende Wirkung von Aldo/MR auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung beschrieben wurde. Aldo (10 nM) erhöht das intrazelluläre Calciumniveau und verkürzt die Zeit bis zum Eintreten eines AngII (100 nM)-induzierten Calcium-Peaks. Aldo zeigte jedoch weder einen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der AngII-induzierten zellulären Calcium-Reaktionsmuster, noch auf das Ausmaß der Peaks bzw. Plateaus und die Form des Peaks. Die schnelle Calcium-Antwort auf AngII bietet unter den verwendeten Konzentrationen somit zunächst keinen Ansatz für eine Erklärung einer Wechselwirkung von AngII/AT1R und Aldo/MR. Verschiedene Kombinationen von Aldo- und AngII-Konzentrationen führen in Anwesenheit des MR und AT1R zu einer Abnahme der absoluten Aktivität am GRE im Vergleich zur alleinigen Gabe von Aldo. Dies ist am ehesten durch einen allgemein hemmenden Einfluss von AngII/AT1R auf die Transaktivierungsaktivität am GRE bedingt. Dagegen bleibt die relative Aktivierung des MR durch Aldo erhalten und zeigt sich zum Teil gesteigert.

Insgesamt liefern die Ergebnisse der durchgeführten Experimente weitere Evidenz für eine komplexe Interaktion von AngII/AT1R und Aldo/MR. In dem definierten System zeigt sich, dass die Anwesenheit von AT1R und MR hinreichend ist für eine hemmende, nicht jedoch für eine positive Interaktion.

Cuno, Robert: Interaktion der Signaltransduktion von humanem Mineralokortikoidrezeptor und humanem AngiotensinII-Rezeptor Typ I, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	1
1.2.	Angiotensin II und AT1R	2
1.2.1.	AngiotensinII-Rezeptor Typ 1 (AT1R)	2
1.2.2.	AT1R-vermittelte Effekte des Angiotensin II	3
1.3.	Aldosteron und Mineralokortikoidrezeptor	4
1.3.1.	Mineralokortikoidrezeptor	4
1.3.2.	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Aldo/MR	5
1.3.3.	Klassische Effekte von Aldo/MR	6
1.3.4.	Nicht-klassische Effekte von Aldo/MR	7
1.4.	Gemeinsam von AngII/AT1R und Aldo/MR genutzte Signalvermittler	9
1.4.1.	Aktivierung von Phospholipasen und PKC-Isoformen	9
1.4.2.	Transaktivierung des EGFR	11
1.4.3.	Aktivierung der MAPK ERK1/2	13
1.4.4.	Beeinflussung des intrazellulären Calciumhaushalts	15
1.5.	Interaktion zwischen der MR- und AT1R-Signalkaskade	16
1.5.1.	Gegenseitige Beeinflussung der Hormonspiegel/Rezeptorexpression	17
1.5.2.	Potenzierung der AngII-Wirkung auf intrazelluläre Signale durch Aldo	17
1.5.3.	Effekte von Aldo in Abhängigkeit vom AT1R	17
1.5.4.	Beteiligung des MR an pathologischen AngII-Effekten	18
2.	Zielstellung	19
3.	Material und Methoden	20
3.1.	Materialien	20
3.2.	Plasmide und Plasmidgewinnung	22
3.3.	Zellkultur	23
3.4.	Transiente Transfektion	23
3.5.	Fluoreszenzmikroskopie	24
3.6.	RT-PCR (Reverse Transkription)	24
3.7.	Proteinbiochemische Methoden	24
3.7.1.	Zellinkubation für Western Blot	24
3.7.2.	Proteinisolierung	25
3.7.3.	Bicinchoninsäure (BCA)-Assay	25
3.7.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	25
3.8.	Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration	26
3.8.1.	Prinzip und Versuchsaufbau	26

3.8.2.	Auswertungsschema	27
3.9.	Reporter-Gen-Assays	29
3.9.1.	Transfektion und Inkubation	29
3.9.2.	SEAP-GRE-Assay	29
3.9.3.	β -Galaktosidase-Assay	30
3.10.	Statistik und verwendete Software	30
4.	Ergebnisse	31
4.1.	Aufbau des Modells	31
4.1.1.	Expression des MR und des AT1R	31
4.1.2.	Funktionsfähigkeit des MR und des AT1R	32
4.2.	Betrachtung der Phosphorylierung von ERK1/2	32
4.2.1.	Kontrollbedingungen	32
4.2.2.	Variation der Inkubationsdauer	33
4.2.3.	ERK1/2-Phosphorylierung bei Anwesenheit des MR und AT1R	33
4.2.4.	ERK1/2-Phosphorylierung bei Abwesenheit von MR und AT1R	36
4.2.5.	ERK1/2-Phosphorylierung bei alleiniger Anwesenheit von AT1R	38
4.2.6.	ERK1/2-Phosphorylierung durch PMA bei Anwesenheit von MR und AT1R	38
4.2.7.	ERK1/2-Phosphorylierung durch EGF bei Anwesenheit von MR und EGFR	39
4.3.	Betrachtung der zellulären Calcium-Homöostase	40
4.3.1.	Verteilung der Reaktionstypen	41
4.3.2.	Betrachtung des Reaktionstypus „Peak“	41
4.3.3.	Betrachtung des Reaktionstypus „Plateau“	44
4.4.	Betrachtung der genomischen Aktivität am GRE	46
4.4.1.	SEAP-GRE-Aktivität bei Abwesenheit von MR und AT1R	46
4.4.2.	SEAP-GRE-Aktivität bei alleiniger Anwesenheit des MR	46
4.4.3.	SEAP-GRE-Aktivität bei alleiniger Anwesenheit des AT1R	47
4.4.4.	SEAP-GRE-Aktivität bei Anwesenheit des MR und AT1R	48
5.	Diskussion	52
5.1.	Ebenen einer möglichen Wechselwirkung in der Signaltransduktion von AT1R und MR	52
5.2.	Wechselwirkung von AT1R und MR im Hinblick auf die ERK1/2-Phosphorylierung	52
5.3.	Wechselwirkung von AT1R und MR im Hinblick auf die zelluläre Calcium-Homöostase	58
5.3.1.	Einfluss von Aldo/MR auf den Reaktionstyp der Zellen	58
5.3.2.	Einfluss von Aldo/MR auf Zellen mit Reaktionstyp „Peak“	59
5.3.3.	Einfluss von Aldo/MR auf Zellen mit Reaktionstyp „Plateau“	59

5.4.	Wechselwirkung von AT1R und MR in Hinblick auf die genomische Aktivität am GRE	60
5.4.1.	Aktivität am GRE in Abwesenheit von MR und/oder AT1R	60
5.4.2.	Aktivität am GRE bei Verfügbarkeit von MR und AT1R	60
5.4.3.	Hemmende Wirkung von AngII/AT1R auf die Aktivität am GRE-Promotor	61
6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	64
8.	Thesen	79

Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD-2	11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2
A+A	Kombination von Angiotensin II und Aldosteron
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
AF	Activation Function
Aldo	Aldosteron
AngII	Angiotensin II
AP-1	Activator Protein-1
AS	Aminosäuren
AT1R	AngiotensinII-Rezeptor Typ 1
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
bp	Basenpaare
cADPR	Cyclic Adenine Diphosphate Ribose
Ca ²⁺	Calcium
Cav-1	Caveolin-1
CHIF	Channel-inducing Factor
CHO	Chinese Hamster Ovary
CICR	Calcium-induzierter Calcium-Release
DAG	Diacylglycerin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
E+A	Kombination von Epidermal Growth Factor und Aldosteron
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ENaC	epithelialer Natriumkanal
EMPHASIS-HF	Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure
EPHESUS	Eplerenone Post Acute Myocardial Infarction Efficacy and Survival Study
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazellulärmatrix

FCS	fetales Kälberserum
GC	Glukokortikoide
GDP	Guanindiphosphat
ggü.	gegenüber
GILZ	Glukokortikoid-induziertes Leucin Zipper Protein
GPGR	G-Protein-gekoppelter Estrogenrezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GR	Glukokortikoid Rezeptor
GRE	Glukokortikoid Response Element
GRK	G-Protein Rezeptor Kinasen
GTP	Guanintriphosphat
HB-EGF	Heparin-gebundenes EGF
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HHB	Breite in der halben Höhe
HRE	Hormon Response Element
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptoren
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MDM2	Murine Double Minute Gene 2
MKP-1	MAP Kinase Phosphatase-1
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MRE	Mineralokortikoid Response Element
mRNA	messenger RNA
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NDRG2	N-myc Downstream-regulated Gene 2
NFκB	Nuclear Factor κB
n.s.	nicht signifikant
NTD	N-terminale Domäne
ONPG	O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
P+A	Kombination von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat und Aldosteron
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese

PAI	Plasmin-Aktivator-Inhibitor
PKC-1	Phosphoinositide-dependent Kinase-1
PGF	Placental Growth Factor
PI-3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKD1	Proteinkinase D1
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP5	Protein-Phosphatase 5
PTB	Phosphotyrosin Binding
Pyk2	Proline Rich Tyrosine Kinase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
RGS	Regulatoren der G-Protein-Signalgebung
RKIP	Raf-Kinase-Inhibierungsprotein
ROMK	Renal Outer Medullary K ⁺ Channel
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase Chain Reaction
RyR	Ryanodinrezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEAP	Sekretorische alkalische Phosphatase
S.E.M.	Standardfehler
SERCA	Sarkoplasmatisches Retikulum Calcium ATPase
Sgk1	Serum und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1
SH2	Src-homology2
sign.	signifikant
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TRPC	Transient Receptor Potential Channel
Veh	Vehikel
VGCC	Voltage Gated Calcium Channel
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
u.a.	unter anderem
UPAR	Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

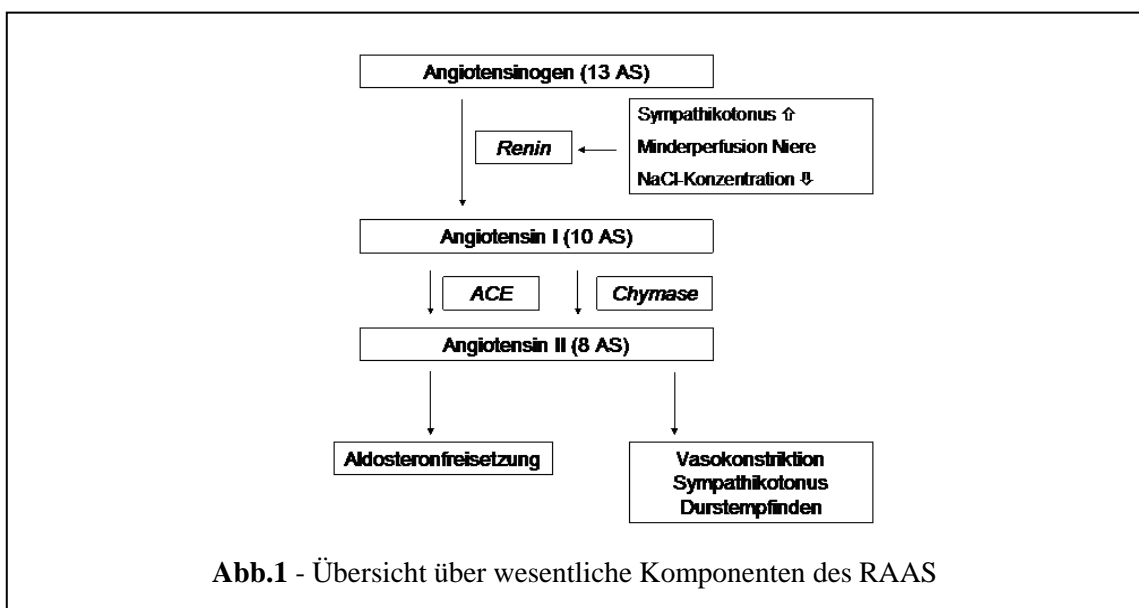
1. Einleitung

1.1. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) stellt eine Hormonkaskade dar, welche unter anderem zur Synthese von Angiotensin II (AngII) und Freisetzung von Aldosteron (Aldo) führt (s. Abb.1). Physiologisch ist das RAAS an der Regulation des Blutdruckes, des Plasmavolumens, des Durstempfindens und der Modulierung des Sympathikotonus entsprechend den jeweiligen physischen Erfordernissen beteiligt [1].

Das RAAS kann in ein zirkulierendes bzw. „klassisches“ RAAS und ein gewebebasiertes RAAS eingeteilt werden. Im zirkulierenden RAAS wird aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere Prorenin und Renin in den Blutkreislauf abgegeben [2]. Adäquate Stimuli hierfür sind Veränderungen der Perfusion der afferenten Arteriolen der Niere, ein erhöhter Sympathikotonus oder eine zu geringe NaCl-Konzentrationen an der Macula densa [3]. Angiotensinogen ist ein Peptid aus 13 Aminosäuren (AS), welches konstitutiv in der Leber gebildet und in den Kreislauf abgegeben wird. Die Protease Renin wandelt Angiotensinogen zum Dekapeptid Angiotensin I um. Angiotensinogen liegt in deutlich höheren Konzentrationen im Kreislauf vor als die nachgelagerten Stufen des RAAS. Somit hat die Konzentration von Renin den entscheidenden Einfluss auf die Konzentrationen der nachgelagerten, vasoaktiven Metabolite [4]. Angiotensin I wird durch das Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) in das Oktapeptid AngII umgesetzt. ACE zirkuliert im Blut, ist aber auch am Endothel verschiedener Gefäßgebiete, insbesondere in der Lunge zu finden. Alternativ kann die Umwandlung von Angiotensin I in AngII auch durch die Chymase der Mastzellen im kardiovaskulären Gewebe, in der Niere oder humanen Gefäßen erfolgen [1]. Daneben existieren einige weitere Metabolisierungspfade [1, 5]. AngII wird durch Aminopeptidasen abgebaut [1], kann aber auch durch das ACE2 zu Ang(1-7) umgewandelt werden [6].

Das gewebebasierte RAAS ist in verschiedenen Organen anzutreffen, so z.B. in Herz, Nieren,



Gehirn und im Fettgewebe und es kann unabhängig, wie in den Nebennieren und im Gehirn oder in enger Wechselbeziehung mit dem zirkulierenden RAAS, wie im Herz und in den Nieren operieren [7]. Seine maximale Aktivität entfaltet es wohl in der Phase der Organentwicklung, danach nimmt seine Aktivität wieder ab. Die Funktion dieses RAAS liegt möglicherweise in einem Beitrag zur regionalen Blutflusssteuerung [1].

1.2. Angiotensin II und AT1R

1.2.1. AngiotensinII-Rezeptor Typ 1 (AT1R)

Der AT1R ist der am besten untersuchte Rezeptor für AngII. Er ist in einer Vielzahl von Organen anzutreffen, unter anderem in Leber, Nebenniere, Gehirn, Lunge, Nieren, Herz und Gefäßen [8]. In Gefäßen findet man den AT1R in hohen Konzentrationen in den glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC = vascular smooth muscle cells) und nur in geringem Maß in der Adventitia. Es handelt sich um ein Glykoprotein aus 359 AS mit einer Größe von 40 kDa welches zur Familie der 7-Transmembran G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gehört [1]. Kodiert wird der humane AT1R auf Chromosom 3q. Beim Menschen existieren, im Gegensatz zu den Nagern, keine Subtypen, jedoch entstehen durch alternatives Splicing zwei Isoformen des AT1R, wobei sich die beiden Isoformen funktionell nicht unterscheiden [9, 10].

Die Bindung von AngII an den AT1R induziert eine Konformationsänderung, woraufhin der AT1R u.a. mit verschiedenen G-Proteinen interagieren kann. G-Proteine sind Heterotrimere, welche aus einem G $\beta\gamma$ -Dimer und einer Guanindiphosphat (GDP)-bindenden G α -Untereinheit bestehen. Der AT1R kann verschiedene G α -Untereinheiten mit unterschiedlichen Signalaktivitäten binden, insbesondere spielen hier G $\alpha_q/11$, G $\alpha_{12/13}$ und G α_i eine Rolle. Der ligandengebundene AT1R katalysiert den Austausch von GDP gegen Guanintriphosphat (GTP), was zu einer Dissoziation von G α und G $\beta\gamma$ führt und diesen eine Interaktion mit verschiedenen Effektoren ermöglicht [8, 11]. Die G α -Untereinheit besitzt eine intrinsische GTPase-Aktivität, welche GTP zu GDP hydrolysiert und damit die Reassoziierung der G-Proteine ermöglicht. Die Dauer und Intensität des Signals der G-Protein-Untereinheiten am AT1R wird durch Regulatoren der G-Protein-Signalgebung (RGS) gegenläufig beeinflusst, welche die GTPase aktivieren oder die Interaktion der G α -Untereinheit mit nachgelagerten Signalmolekülen behindern können [12]. Die mRNA von RGS2, welches G α_q hemmt wird nach Stimulation mit AngII teils PKC-abhängig hoch reguliert [13]. Der AT1R wird einige Minuten nach Aktivierung endozytiert, wobei ein kleinerer Teil der internalisierten Rezeptoren zur Membran zurück recycelt wird, während der Rest in Lysosomen abgebaut wird [14]. Die Internalisierung des AT1R kann über Caveolae erfolgen, wobei AngII die Assoziation des AT1R mit Caveolin-1 (Cav-1) fördert [14-16].

Neben den G-Proteinen sind auch die G-Protein Rezeptor Kinasen (GRK) und die Arrestine (mit dem ubiquitär exprimierten Arrestin 2 = β -Arrestin1 und Arrestin 3 = β -Arrestin2) in der

Lage, mit dem ligandenaktivierten AT1R zu interagieren. Die verschiedenen GRKs erzeugen unterschiedliche Phosphorylierungsmuster am AT1R, was Einfluss auf die Konformation der rekrutierten β -Arrestine nehmen kann. β -Arrestine behindern die Bindung von G-Proteinen an den AT1R, steuern aber auch weitere intrazelluläre Vorgänge als Scaffold (=Gerüst)-Proteine. Die GRK2/3 werden über $G\beta\gamma$ zur Membran rekrutiert und erhöhen die Affinität des AT1R zu β -Arrestinen mit nachfolgender Internalisierung in spezialisierten „Coated Pits“ mit Clathrin. Die konstitutiv an die Membran gebundenen GRK5/6 scheinen an einer G-Protein-unabhängigen, β -Arrestin-mediierter Aktivierung des Extracellular Signal Regulated Kinase (ERK)1/2-Signalweges beteiligt zu sein [17-19].

Die Funktion des AT1R wird zudem durch weitere Regulations- und Modulationsmöglichkeiten modifiziert. So bildet der AT1R mit sich selbst, aber auch mit einem weiteren AngII-Rezeptor, dem AT2R und anderen Rezeptoren Dimere [20-22]. Chronisch erhöhte Spiegel von AngII mindern die Expression des AT1R. Eine Reihe weiterer Hormone beeinflusst die Expression des AT1R [14]. Der AT1R selbst ist auch ein Ziel für die PKC [23].

1.2.2. AT1R-vermittelte Effekte des Angiotensin II

AngII vermittelt seine Wirkung über den AT1R an einer Reihe von Organen und Zelltypen. Diese Wirkungen dienen in erster Linie der physiologischen Funktion von AngII, also der Stabilisierung des Blutdrucks. Beispiele hierfür sind die Kontraktion der vaskulären glatten Gefäßmuskulatur, die Verstärkung der sympathisch vermittelten Vasokonstriktion [24], die Steigerung der Synthese und Freisetzung von Aldosteron und die Einflussnahme im ZNS auf den Sympathikotonus, Durstempfinden und die Autoregulation des zerebralen Blutflusses [14]. Der Einfluss auf die kardiale Kontraktilität ist komplex; es gibt Berichte über positive, negative oder gar keine Wirkungen [25].

AngII kann über den AT1R auch an der Pathophysiologie der Erkrankung verschiedener Organe, insbesondere der Gefäße, Herz und Nieren beteiligt sein. AngII stimuliert über den AT1R in VSMC die Proteinsynthese, Hypertrophie und Proliferation [26]. Dabei induziert AngII in den VSMC eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Proteinen der Extrazellulärmatrix (EZM), Zytokine und Chemokine, die an der Entwicklung von Gefäßerkrankungen beteiligt sind [26]. In Endothelzellen fördert AngII über den AT1R die Akkumulation von Leukozyten an der Gefäßwand, sowie die gesteigerte Produktion von Endothelin-1 [26] und induziert den LDL-Rezeptor, der bei der Bildung von atherosklerotischen Läsionen eine wichtige Rolle spielt [27]. AngII steigert in VSMCs und Endothelzellen über den AT1R die mRNA von Plasmin-Aktivator-Inhibitor (PAI)-1 und PAI-2 und übt so möglicherweise einen Einfluss auf die Thrombosebildung und den Umsatz der EZM aus [28]. Atherosklerotische Plaques humaner Koronarien weisen eine lokale RAAS-Aktivität mit hohen Spiegeln von ACE, AngII und des AT1R auf [29].

In kardialen Myozyten induziert AngII über den AT1R Hypertrophie, eine veränderte Expression von Genen für kontraktile Proteine und die Nekrose. In kardialen Fibroblasten steigert AngII die Proliferation und die Expression fibroseassoziiierter Gene, wie Kollagen Typ I und III sowie Fibronectin [26]. Dabei scheinen für diese Prozesse in den kardialen Myozyten Untereinheiten von Gq-Proteinen entscheidend zu sein, in kardialen Fibroblasten dagegen von Gi-Proteinen [30].

In der Niere kann AngII einen pathologischen Einfluss auf die Zellen des Mesangiums nehmen. Die bei diesen Zellen induzierte Hypertrophie, Proliferation und Produktion von EZM leistet ihren Beitrag zur Glomerulosklerose. Zudem sind auch Veränderungen der Genexpression in renalen epithelialen Zellen unter dem Einfluss von AngII über den AT1R beschrieben worden [26].

1.3. Aldosteron und Mineralokortikoidrezeptor

1.3.1. Mineralokortikoidrezeptor

Der Mineralokortikoidrezeptor gehört zur Familie der klassischen Steroidrezeptoren und damit zu den nukleären Rezeptoren, einer Gruppe von ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren [31, 32]. Der MR wird beim Menschen auf Chromosom 4 in der Region q31.1 kodiert und besteht aus 10 Exons [33]. Das Translationsprodukt weist eine Größe von 107 kDa auf, besteht aus 984 Aminosäuren und besitzt mehrere funktionelle Domänen. Die Domänen des MR werden auch mit A bis E bezeichnet [34, 35].

Die N-terminale Domäne (NTD), die alternativ als A/B-Domäne bezeichnet wird, scheint eine wichtige Funktion im Zusammenhang mit der Transaktivierungsaktivität (Wechselwirkung mit der Transkriptionsmaschinerie) des MR unabhängig vom Liganden zu haben. Es existieren in der NTD zwei Aktivierungsdomänen (Activation function = AF), AF-1a und AF-1b mit einer dazwischen gelegenen zentralen inhibitorischen Domäne. AF-1a und AF-1b sind durch ihre Interaktion mit weiteren zellulären Regulatoren wesentlich an der Modulation und Selektivität der Transaktivierungsaktivität des MR beteiligt [36]. Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) bzw. C-Domäne dient der Interaktion mit den Hormon Response Elementen (HRE), also spezifischen Promotorelementen der DNA für die Bindung des Rezeptors. Die DBD ist mit zwei Zinkfingerdomänen ausgestattet, wobei die eine die feste Bindung an die DNA, die andere die Homo- oder Heterodimerisierung mit einem weiteren Steroidrezeptor vermittelt [36]. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD, E/F-Domäne) ermöglicht die hormonspezifische Aktivierung. Die LBD bindet verschiedene Chaperone wie Hitzeschockproteine (HSP) 70 und 90, aber auch verschiedene Immunophiline. Die LBD besitzt zudem Regionen, welche die Dimerisierung mit MR oder auch Glukokortikoidrezeptoren (GR) ermöglichen und die ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne AF-2 [36-38]. Zwischen DBD und LBD existiert die Scharnierregion (D-Domäne). Sie ermöglicht eine Umlagerung der DBD relativ zur LBD und damit eine

korrekte Positionierung des Rezeptors zur Aktivierung des Transkriptionsapparates. Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Änderung der Konformation in der LBD des MR. Anschließend erfolgt die Translokation des MR in den Zellkern und die Bindung des dimerisierten MR an die HRE von Zielgenen mit aktivierender bzw. hemmender Wirkung auf die Transkriptionsaktivität [39].

Der endogene Ligand bei Menschen für den MR ist das Aldosteron, ein Steroidhormon, welches vorrangig in der der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet wird. Stimuliert wird die Synthese von Aldosteron unter anderem durch Kalium, ACTH, Vasopressin sowie AngII [40]. In physiologischen Konzentrationen bindet Aldo selektiv an den MR. Der MR kann auch durch Glukokortikoide (GC) aktiviert werden. GC haben zum MR eine ähnlich hohe Affinität wie Aldo, kommen aber in 100-1000fach höheren Plasmakonzentrationen als Aldo vor, so dass mit einer dauerhaften Besetzung des MR mit GC zu rechnen wäre [37]. Zudem entsprechen alle bisher definierten HRE des MR denen des GR, also den Glukokortikoid Response Elementen (GRE) [3]. Dennoch sind mineralokortikoidspezifische Effekte am MR in bestimmten Zelltypen zu beobachten und folglich müssen Mechanismen existieren, die dies ermöglichen [37, 41]. Durch Expression der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 (11 β -HSD-2) kann Cortisol in inaktives Cortison umgewandelt und so lokal der Einfluss der GC auf den MR reduziert werden. Die 11 β -HSD-2 wird vorrangig in klassischen epithelialen Zielgeweben mit MR (Niere, Kolon) exprimiert, aber auch in Blutgefäßen und nur in geringem Maße in Herz oder ZNS [37, 42-44]. Auf der Rezeptorebene zeigt sich der Komplex aus Aldo und MR stabiler, da Aldo langsamer vom MR abdissoziiert als Cortisol [37]. Die Fähigkeit des MR gewebe- und ligandenspezifische Wirkungen zu entfalten beruht auch auf seiner Interaktion mit einer Reihe von Bindungspartnern wie Chaperonen, Koregulatoren, anderen Transkriptionsfaktoren und modifizierenden Proteinen. Zudem modulieren Interaktionen zwischen den Domänen des MR den transkriptionellen Komplex [45]. Unter Aldo wurde eine stärkere Interaktion zwischen den N-/C-Termini beobachtet, was für die Rekrutierung von Koregulatoren von Bedeutung scheint [37]. Neue MR-spezifische Promotorelemente, wie z.B. kürzlich für den humanen EGFR-Promotor beschrieben, sind eine weitere Möglichkeit, MR-spezifische Effekte zu erzielen [46, 47]. Schließlich scheint eine Aktivierung des MR durch GC auch vom Redox-Zustand der Zelle abhängig zu sein [48]. Allgemein spielt auch die Gewebeverteilung und das Ausmaß der lokalen Expression des MR und seiner Koregulatoren eine Rolle.

1.3.2. Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Aldo/MR

Die klassische physiologische Aufgabe von Aldo/MR liegt in der Regulation des Elektrolyt- und nachfolgend des Volumenhaushalts, insbesondere im Zusammenhang mit der Blutdruckregulation über das RAAS. Dabei steuert Aldo/MR in erster Linie die Aufnahme von Natriumchlorid über die Epithelien in Niere und Kolon, dem dann in zweiter Linie Wasser

nachfolgt. Begleitet wird dies durch eine Sekretion von K^+ - und H^+ -Ionen. Im zentralen Nervensystem ist Aldo/MR an Veränderungen des Sympathikotonus mit Einfluss auf die Freisetzung von Renin und die Empfindlichkeit des Barorezeptorreflexes beteiligt [3].

Eine Aktivierung von Aldo/MR besitzt aber auch pathophysiologische Bedeutung. Sie scheint eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen zu spielen, was sich in klinischen Studien zeigt [49-51]. Im renokardiovaskulären System kann es durch Aldo bzw. inadäquate MR-Aktivierung zu lang anhaltender klinisch relevanter Hypertonie mit endothelialer Dysfunktion, Inflammation, Remodeling, Hypertrophie und Organschädigung kommen [3, 52]. Eine Aldo/MR-Aktivierung kann sich durch erhöhten zentralen Sympathikotonus mit gesteigerter Renin-Freisetzung, RAAS-Aktivierung und letztlich erhöhter Aldo-Sekretion selbst verstärken. Erhöhte Natriumchlorid-Aufnahme kann zu Veränderungen im Redox-Status kardiovaskulärer Zellen und damit zur Aktivierung von GC-besetzten MR führen und zudem vaskuläre Inflammation fördern. Der aktivierte MR kann durch die Aktivierung bzw. Induktion der NAD(P)H-Oxidase die Bildung von ROS (Reactive Oxygen Species) verstärken und so den Redox-Status beeinflussen. Initiiert durch geeignete Mitspieler, welche ein „permissives“ Milieu mit gesteigerter ROS-Produktion initiieren, z.B. Natriumchlorid oder AngII, kann es so selbst bei normalen oder niedrigen Aldo-Spiegeln zu einer sich selbst verstärkenden Aktivierung des MR kommen [3]. Im Zuge der pathophysiologischen MR-Aktivierung kommt es zur gesteigerten Expression von am vaskulären Remodeling beteiligten Genen, wie AT1R, ACE, NAD(P)H-Oxidase, NF κ B, AP1, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und EGFR. Über primär nicht-genomische Effekte, wie die Transaktivierung des EGFR, Aktivierung zytosolischer Tyrosinkinasen, PKC und Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) wird über die Stimulation der NAD(P)H-Oxidase weiter zum Übergang vom physiologischen zum pathophysiologischen Zustand beigetragen [3].

1.3.3. Klassische Effekte von Aldo/MR

Zu den klassischen Zielgeweben zählen die Epithelien von Niere, Kolon, Schweiß- und Speicheldrüsen [53]. Auch in anderen transportierenden Epithelien von Lunge und Dünndarm konnte eine Expression des MR nachgewiesen werden [54, 55]. Im Mittelpunkt der klassischen Betrachtung steht eine Aktivierung des MR durch Aldo mit nachfolgend gesteigerter Expression von Proteinen, welche Einfluss auf den Transport von Ionen, vor allem Natriumionen, an den Epithelien der klassischen Zielorgane nehmen.

In einer frühen Phase von ca. 1-6 h nach Aldo-Gabe werden über den MR vorrangig Signalproteine induziert, welche Einfluss auf die Aktivität bzw. die Lebensdauer bereits vorhandener Kanäle und Transporter nehmen [56]. Hierzu gehört die Sgk1 (Serum und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1). Die Sgk1 stimuliert die Aktivität und Oberflächenexpression der Na^+/K^+ -ATPase und hemmt den proteasomalen Abbau des

epithelialen Natriumkanals (ENaC) [56, 57], daneben übt die Sgk1 einen Einfluss auf eine Reihe anderer Ionenkanäle aus [58]. In der frühen Phase wird auch das G-Protein Ki-Ras2 induziert, welches die Expression der ENaC an der Zelloberfläche reduziert, aber die Aktivität des einzelnen ENaC erhöht [59]. Das Glukokortikoid-induzierte Leucin Zipper Protein (GILZ) wird durch Aldosteron nach 30 min verstärkt exprimiert. In T-Zellen hemmt es die Raf-1-Phosphorylierung und behindert damit die ERK1/2-Phosphorylierung. In EGF-behandelten HEK293-Zellen steigert es die Oberflächenexpression des ENaC. Über die Inhibierung des ENaC-hemmenden ERK1/2-Signalwegs kommt es zu einer gesteigerten ENaC-Aktivität [60, 61]. Der früh induzierte Channel-inducing Factor (CHIF) erhöht die Natriumaffinität und damit die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase [60]. In der frühen Phase steigert Aldosteron die Pumpleistung der Na^+/K^+ -ATPasen auch über eine Rekrutierung von Natriumpumpen aus einem intrazellulären Reservoir zur Membran [62].

In einer späten Phase ab ca. 6 h kommt die direkte Induktion von Transport- und Kanalproteinen zum tragen [56]. Hierzu gehören die α - und β -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase [63] und Untereinheiten des ENaC [64-66]. Zu den weiteren Genen, deren Expression durch Aldosteron in Epithelien gesteigert wird, gehören unter anderem das N-myc Downstream-regulated Gene 2 (NDRG2), Endothelin-1 (ET-1) und PAI-1 [36]. Auch auf die Expression des ROMK (Renal Outer Medullary K^+ Channel) und weiterer Kaliumkanäle nimmt Aldo Einfluss [67-70].

1.3.4. Nicht-klassische Effekte von Aldo/MR

Als nicht-klassische Effekte von Aldo/MR kann man zum einen die Effekte betrachten, die primär nicht-genomischer Natur sind, zum anderen genomische Effekte in nicht-klassischen Zielgeweben mit MR-Expression, wie Herz, Gefäßen, ZNS, Haut und Fettgewebe [36]. Eine Unterteilung der zellulären Effekte in genomisch und nicht-genomisch hat vor dem Hintergrund beschriebener Wechselwirkungen zwischen diesen Effekten an Schärfe verloren [52, 71, 72]. Durch direkte Phosphorylierung des MR oder Beeinflussung von Kofaktoren der MR-initiierten Transkription können Komponenten primär nicht-genomischer Signalgebung Einfluss auf die genomische Wirkung von Aldo über den MR ausüben [71]. So wurde nach Aldo-Gabe am MR ein schnelle Phosphorylierung unter Beteiligung der PKC- α beobachtet, wobei eine Hemmung des frühen Aldo-induzierten PKC- α -Signalwegs zu einer reduzierten MR-Transaktivierungsaktivität führt [73]. Eine ERK1/2-Aktivierung verstärkt die genomische Aldo/MR-Antwort am GRE [74, 75]. Die genomische Wirkung von Aldo/MR nimmt über die verstärkte Expression von Signalproteinen Einfluss auf die primär nicht-genomisch aktivierten Signalkaskaden, beispielsweise durch gesteigerte Expression und EGF-Empfindlichkeit des EGFR [46].

Zu den primär nicht-genomischen Effekten von Aldo in klassischen Zielgeweben zählen unter anderem die Aktivierung der PKC, der Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} sowie die Aktivierung

von PKD, EGFR, ERK1/2 und NHE. In der Folge kommt es zu Veränderungen von intrazellulärem pH und Natrium welche das Zellvolumen und pH-sensitive Transporter wie die K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanäle beeinflussen. Die physiologische Bedeutung könnte in der Regulation des Zellvolumens unabhängig vom pH oder des Membranpotentials unabhängig von der Natriumreabsorption liegen [52, 71], möglicherweise überbrücken die nicht-genomischen Effekte die Latenzzeit bis zur Wirkung der genomischen Effekte [56].

In nicht-klassischen Zielgeweben wurden primär nicht-genomische Effekte unter anderem an Gefäßen und kardialen Zellen beobachtet. Die Wirkung von Aldo/MR auf den Gefäßtonus hängt von dem Grundzustand des Gefäßes und dem vorrangig angesprochenen Zelltyp ab [76]. Physiologisch fördert Aldo über eine PI-3K-vermittelte Stimulation der eNOS [77] die NO-Ausschüttung im Endothel und damit eine Dilatation des Gefäßes. In VSMC fördert Aldo über PLC, IP_3 , Ca^{2+} , PKC, PI-3K und MLCK dagegen die Vasokonstriktion [78-81]. Pathologisch fördert Aldo im Endothel die ROS-Produktion, die Entkopplung der eNOS, den Verbrauch von NO zur Peroxynitritbildung und senkt die Expression der G6PDH [76, 82, 83], was insgesamt die Vasokonstriktion begünstigt. Bei endothelialer Dysfunktion fördert Aldo durch Überwiegen der VSMC-Wirkkomponente die arterielle Hypertonie [84, 85].

Am Herzen übt Aldosteron direkten Einfluss auf Transporter der Kardiomyozyten aus und fördert Remodeling. Eine durch die PKC- ϵ vermittelte direkte Hemmung der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und die Aktivierung des $Na^+/K^+/-2Cl^-$ -Kotransporters zeigten sich durch MR-Antagonisten komplett hemmbar [86]. In Kardiomyozyten wurde auch eine positiv inotrope Wirkung von Aldo durch intrazellulären pH-Anstieg infolge einer NHE-Aktivierung beobachtet [87]. Zudem wurde eine Induktion der Matrix-Metallo-Proteinase (MMP)-Aktivität durch Aldo über den MR in Abhängigkeit von PKC, ROS und Aktivierung von ERK1/2 beschrieben [88]. Ein weiterer Effekt am Herzen ist ein schneller PKC-abhängiger Abfall des koronaren Blutflusses nach intrakoronarer Gabe von Aldo, der bei einer Ischämie zu einer Zunahme des kardialen Schadens und des Remodelings führt [89].

In den nicht-klassischen Zielgeweben wurden genomische Effekte von Aldo/MR beschrieben und eine Reihe von Zielgenen für Aldo/MR identifiziert, wobei die biologische Funktion teils unklar bleibt. Beispiele für eine verstärkte Expression durch Aldo/MR sind Osteopontin und ACE in aortalen Endothelzellen. In glatten Muskelzellen fand sich eine gesteigerte Expression von EGFR und MDM2 (Murine Double Minute Gene 2), in kardialen und renalen Fibroblasten von Kollagen I, III und IV. Auch hemmende Effekte auf die Expression von Genen wurde unter Aldo/MR gesehen, wie im Fall der G6PDH im Endothel der Koronarien oder von UPAR (Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor) am Herzen [36]. Dabei wird der genomische Effekt zum Teil direkt durch Bindung des MR an Promotoren vermittelt, wie im Fall des EGFR in VSMC [46], zum Teil auch über die Aktivierung von Signalproteinen wie dem EGFR, wie im Fall von ACE in Endothelzellen [90]. In ventrikulären Kardiomyozyten wurde eine gesteigerte

Expression von L- und T-Typ-Calciumkanälen unter Gabe von Aldo gesehen [91]. An Gefäßen wurde eine Aldo/MR-abhängige gesteigerte Expression von Placental Growth Factor (PGF) beobachtet, welchem eine Bedeutung bei Gefäßschädigung und Atherosklerose zugemessen wird [92, 93], im Endothel zeigte sich eine verstärkte Expression von Striatin [94].

Der klassische MR scheint nicht für alle schnellen Effekte von Aldo verantwortlich zu sein. So konnte in MR- als auch scheintransfizierten CHO- und HEK293-Zellen der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg nach Aldo-Gabe durch den kompetitiven MR-Antagonisten Spironolacton nicht gehemmt werden [74]. Als möglicher alternativer Rezeptor für schnelle vaskuläre Effekte von Aldo wurde der G-Protein-gekoppelte Estrogenrezeptor (GPER, vormals GPR30) beschrieben [95-97].

1.4. Gemeinsam von AngII/AT1R und Aldo/MR genutzte Signalvermittler

Eine Übersicht über wesentliche von AngII/AT1R bzw. Aldo/MR genutzte Mechanismen der Signaltransduktion geben die Abbildungen 2 und 3. Die gemeinsam genutzten Signalvermittler werden im Folgenden dargestellt.

1.4.1. Aktivierung von Phospholipasen und PKC-Isoformen

Die Familie der PLC besteht aus einer Reihe von Isoformen, wobei die PLC- β durch G-Protein-Untereinheiten, die PLC- γ durch Tyrosinkinasen und die PLC- δ durch Calcium reguliert werden [98]. Die PLC erzeugt innerhalb von Sekunden Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 bindet als Second Messenger an Rezeptoren intrazellulärer Calciumspeicher und sorgt für eine Freisetzung von Ca^{2+} . DAG aktiviert, zum Teil in Kombination mit Ca^{2+} , Proteinkinase C (PKC)-Isoformen, wobei es sich hierbei eher um eine kurzzeitige Aktivierung handelt. Eine anhaltende Aktivierung der PKC kann über die Aktivierung der Phospholipase D (PLD) mit anhaltender Freisetzung von Phosphatidat, welches schnell in DAG umgewandelt wird, erfolgen. Hierbei spielen $\text{G}\alpha_{12}$ und $\text{G}\beta\gamma$ unter Beteiligung von c-Src eine Rolle [99]. Die konventionellen PKCs (cPKCs; α , βI , βII , γ) werden abhängig von DAG (oder Phorbolestern wie PMA) und Ca^{2+} aktiviert. Die neuen PKCs (nPKCs; δ , ϵ , θ , η) werden durch DAG oder PMA aktiviert, unabhängig von Ca^{2+} . Atypische PKCs (ζ , ι , λ) binden PIP3 und Ceramide, aber kein DAG oder PMA, ihre Aktivierung hängt von Protein-Protein-Interaktionen und der Phosphorylierung durch die Phosphoinositide-dependent Kinase-1 (PDK-1) ab [100].

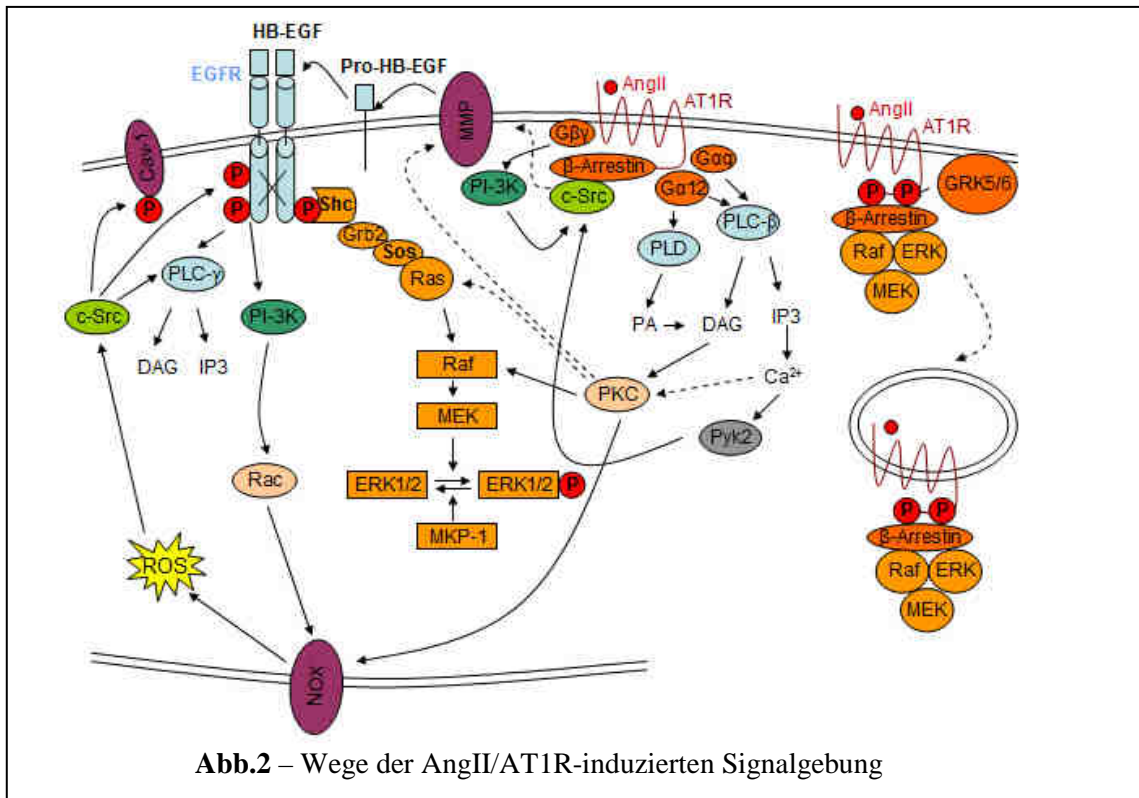


Abb.2 – Wege der AngII/AT1R-induzierten Signalgebung

Nach der Aktivierung des AT1R durch AngII erfolgt über $G\alpha_{11\beta}$ und $G\alpha_{12\beta}$ zunächst die Aktivierung der Phospholipase C (PLC)- β , kurz danach auch der PLC- γ durch aktivierte Tyrosinkinasen [101]. DAG und Calcium führen dann, wie oben beschrieben, zu einer Aktivierung von PKC-Isoformen. Die PKC kann $G\alpha_{12}$ phosphorylieren und damit die Reassoziierung mit $G\beta\gamma$ verhindern, was zu einer verlängerten PKC-Aktivität führt [102]. Eine PLD/PKC-vermittelte Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase initiiert mit einem ersten Peak nach ca. 30 Sek. eine biphasische ROS-Freisetzung durch AngII. Das erzeugte H_2O_2 aktiviert c-Src und diese den EGFR, welcher wiederum über die PI-3K und PIP3 für eine Rac-Aktivierung sorgt. Rac aktiviert anhaltend die NAD(P)H-Oxidase mit einem ROS-Peak bei 30 Min [103]. Zu den ROS-abhängigen AngII-vermittelten Effekten zählt neben der Aktivierung von Src und des EGFR auch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1 [104]. Die PI-3K γ kann Src aktivieren und ist selbst ein direktes Ziel von $G\beta\gamma$ -Unterheiten von G-Proteinen [105].

Aldo sorgt in VSMC über eine Aktivierung der PLC für einen schnellen Anstieg von DAG und eine Aktivierung der PKC- α [106]. Auch in renalen CCD-Zellen konnte eine schnelle Aktivierung der PKC- α beobachtet werden [73, 107]. Bei der Aktivierung der PKC- α durch Aldo scheint auch eine direkte spezifische Bindung von Aldo an die Kinase eine Rolle zu spielen, welche zumindest eine koaktivierende Bedeutung hat [108], in einem zellfreien Assay-System wurde eine direkte Aktivierung der PKC- α beobachtet [109]. Auch die PKC- δ und PKC- ϵ können schnell durch Aldo aktiviert werden, allerdings nicht durch direkte Bindung von Aldo an die Kinase, sondern über den MR durch Transaktivierung des EGFR. Ein Substrat für

die PKC- δ und die PKC- ϵ ist die Proteinkinase D1 (PKD1) [110, 111]. Die PKC ist zum Teil am Aldo-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg beteiligt [112, 113]. Da die PKC- α wiederum durch Ca^{2+} koaktiviert wird, ist auch eine Wechselwirkung zwischen Ca^{2+} -abhängigen und unabhängigen PKC-Isoformen denkbar.

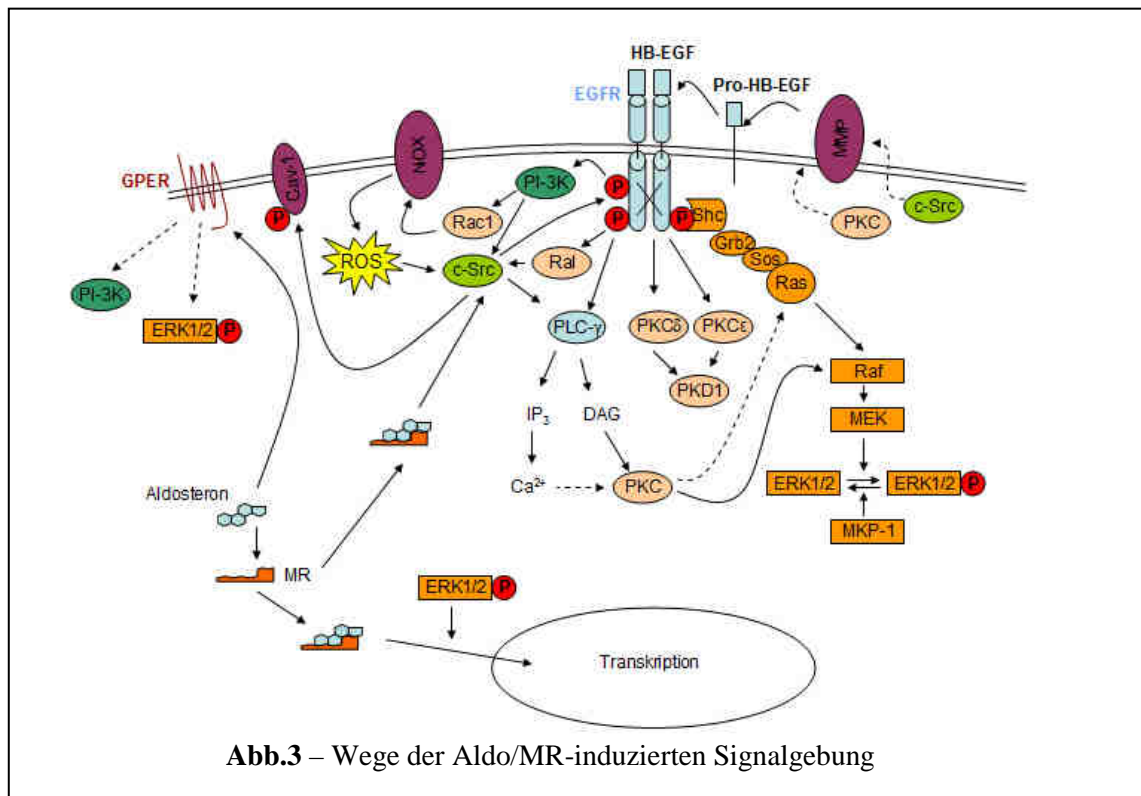


Abb.3 – Wege der Aldo/MR-induzierten Signalgebung

1.4.2. Transaktivierung des EGFR

Der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) gehört zu den Rezeptortyrosinkinasen und spielt eine wichtige Rolle bei den pathophysiologischen Effekten von AngII/AT1R im Hinblick auf die Induktion von Fibrosen und kardialer Hypertrophie [3, 104, 114-116] sowie pathophysiologischen Effekten von Aldo/MR im Hinblick auf Zellproliferation und Remodeling im renokardiovaskulären System [115, 117, 118]. AngII und Aldo sind in der Lage, über ihre Rezeptoren vermittelt eine Aktivierung des EGFR zu induzieren, was als Transaktivierung bezeichnet wird.

Eine Transaktivierung des EGFR durch AngII/AT1R kann zum einen durch die Aktivierung von MMP mit Freisetzung von membrangebundenem HB-EGF in einem „Triple-Membrane-Passing“-System mit anschließender Dimerisierung und Autophosphorylierung des EGFR an spezifischen Tyrosinresten erfolgen [15, 119, 120]. Alternativ ist die Aktivierung durch intrazelluläre Signalwege unter Beteiligung von c-Src mit Trans-Phosphorylierung des EGFR an einem anderen Tyrosinrest möglich [15]. In VSMC führt eine Ca^{2+} - und PKC-abhängige Aktivierung der Pyk2 (Proline Rich Tyrosine Kinase) durch AngII zur Aktivierung von c-Src. Der EGFR kann seinerseits, wie auch andere durch c-Src aktivierte Proteine, zu einer weiteren

Aktivierung von c-Src führen [14]. Die Aktivierung des EGFR durch HB-EGF scheint aufgrund einer schnellen Endozytose und anschließenden Degradierung des EGFR nur zu einer kurz (1 Stunde) anhaltenden ERK1/2-Aktivierung zu führen, während die Aktivierung des EGFR über ROS/Src über eine Assoziation von Cav-1 und EGFR in caveolin-reichen Lipid-Rafts zu einer verlängerten EGFR-ERK1/2-Signalgebung führt [15]. Eine Beteiligung von β -Arrestin2 an der Transaktivierung des EGFR durch AngII/AT1R ist beschrieben worden [17, 121]. Die unterschiedlichen erzeugten Tyrosin-Phosphorylierungsmuster am EGFR können funktionelle Unterschiede bedeuten, eine Aktivierung von ERK1/2 kann jedoch durch beide erfolgen [122]. An die phosphorylierten Tyrosin-Reste können Src-homology2 (SH2)- und Phosphotyrosin Binding (PTB)-Domänen binden, unter anderem von Adapterproteinen wie Shc und Grb2 sowie von Enzymen wie der PLC- γ [123]. Über Grb2 und den assoziierten GTP-Austauschfaktor Sos wird Ras aktiviert, welches dann die MAPK-Kaskade aktiviert [105].

Eine ligandeninduzierte EGFR-Aktivierung kann über eine PI-3K- und PKC-abhängige Phosphorylierung des AT1R zu einer reduzierten Verfügbarkeit des AT1R an der Membran und der IP₃-Antwort führen. Es wurde auch die Bildung eines Multirezeptorkomplexes von AT1R und transaktiviertem EGFR unter Beteiligung von Cav-1 beobachtet, wobei sowohl AngII als auch EGF zur Assoziation von AT1R mit Caveolin führten [124]. Auch in anderen Studien wurde eine Assoziation von agonistenaktiviertem AT1R und Caveolin in VSMC beobachtet (siehe Abschnitt 1.2.1. und [125]). Möglicherweise übt Cav-1 einen hemmenden Effekt auf die EGFR-Transaktivierung aus [126].

Hinsichtlich der Mechanismen der Transaktivierung des EGFR durch Aldo/MR finden sich sowohl Hinweise auf zytosolische Wege über c-Src oder ROS, als auch für Transmembranprozesse über MMP [127]. Über die Aktivierung der Ral-ATPase aktiviert der EGFR seinerseits wiederum c-Src [128]. Aldo/MR übt über den EGFR neben und teils über c-Src unter anderem Einfluss auf die Aktivität der PKC [112], PKD1 [110], Ki-Ras2a [129], RhoA/Rhokinase [130], ROS [131] und die NAD(P)H-Oxidase [130, 132] aus. C-Src und der EGFR sind an der Aldo-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 in verschiedenen Zelltypen (MDCK, CHO, HEK293, VSMC) beteiligt [74, 129-131, 133, 134]. Beim Anstieg des intrazellulären Calciums nach Gabe von Aldo spielen ebenfalls Wege unter Beteiligung des EGFR eine Rolle [74, 133]. Eine Schlüsselstellung des EGFR bei der Aldo-vermittelten vaskulären Reaktivität konnte in-vivo beobachtet werden [135]. Eine Aktivierung von Ki-RasA/c-Raf/MEK/ERK-Signalwegen durch redoxsensitive EGFR-Transaktivierung wurde in Mesangiumzellen beobachtet [136]. Eine hemmende Wirkung der PKC auf die Aldo-induzierte EGFR-Transaktivierung konnte, wie auch schon für eine AngII/Gq-induzierte EGFR-Transaktivierung beobachtet werden [134, 137]. Der EGFR kann Rac1 aktivieren, welches wiederum die NAD(P)H-Oxidase aktiviert und zudem die Aktivität des MR positiv beeinflussen kann [138-140]. In der Interaktion von EGFR und MR spielt möglicherweise die Kollokalisierung

an der Zellmembran eine Rolle. Für die Kolokalisation genügten die EF-Domänen des MR [141].

Eine Zunahme von mRNA oder Protein des EGFR durch Aldo/MR konnte in verschiedenen Zelltypen beobachtet werden [46, 142-145]. Hierdurch kann Aldo/MR nicht nur seine eigene Wirkung, sondern auch die von AngII beeinflussen.

1.4.3. Aktivierung der MAPK ERK1/2

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen beeinflussen zellulär Proteinsynthese, Metabolismus, Transport, Volumenregulation, Genexpression und Wachstum. Am besten untersucht ist die Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2. Sie trägt pathophysiologisch zu Zellwachstum, Hypertrophie und Inflammation bei [14]. ERK1/2 kann u.a. Transkriptionsfaktoren (z.B. Elk-1 oder c-Myc), ihre eigenen Regulatoren (z.B. EGFR und Sos) oder regulatorische Enzyme wie die Phospholipase A₂ (PLA₂) aktivieren [105]. Die MAPK werden durch eine dreistufige Proteinkinase-Kaskade aktiviert. Hierbei aktiviert eine MAPK-Kinase-Kinase eine MAPK-Kinase, welche dann letztlich die MAPK phosphoryliert [146]. Beim humanen ERK1/2-Signalweg bilden Raf, MEK und ERK1/2 die entsprechenden Stufen. Die Raf-Familie besteht aus A-Raf, B-Raf und C-Raf (Raf-1). Dabei hat B-Raf die stärkste Potenz zur Aktivierung von MEK, A-Raf die geringste. Eine Raf-Aktivierung kann durch eine Rekrutierung zur Membran durch Ras, Dimerisierung, (De-)Phosphorylierung, Trennung vom Raf-Kinase-Inhibierungsprotein (RKIP) und Assoziation mit Gerüstproteinen erfolgen. Die Raf-Aktivität wird zudem durch Chaperone wie HSP90 moduliert. Eine maximale Aktivierung erfordert bei Raf-1 und A-Raf sowohl die Aktivität von Ras und Src, dagegen ist sie bei B-Raf von Src unabhängig. Über die PKC- α kann Raf-1 durch direkte Phosphorylierung aktiviert werden, auch B-Raf kann Raf-1 phosphorylieren [147].

Eine Inaktivierung von ERK1/2 erfolgt durch die MAP Kinase Phosphatase-1 (MKP-1) [14]. ROS können die ERK1/2-Aktivierung über eine ligandenunabhängige EGFR- und nachfolgende Ras-Aktivierung beeinflussen. Die durch ROS aktivierte c-Src kann direkt die PLC- γ aktivieren mit einer daraus resultierenden Aktivierung von PKC-Isoformen. Zudem hemmen ROS Proteinphosphatasen [147].

Die Aktivierung von ERK1/2 durch AngII/AT1R kann über verschiedene Wege erfolgen. Beteiligt ist zum einen die PKC [148-152], deren Aktivierung über Gq-Protein erfolgen kann [17, 153-155]. Teils konnten verantwortliche PKC-Isoformen spezifiziert werden, wie die PKC- δ [156, 157] und die PKC- ζ [17, 158]. Je nach Isoform kann die PKC direkt auf Raf-1 wirken und/oder an der Aktivierung von Src, MMP und der Transaktivierung des EGFR beteiligt sein. Der EGFR ist eine weitere wichtige Schaltstelle in der AngII-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung [15, 151, 152, 157, 159-161]. Seine Transaktivierung kann durch Aktivierung von MMP mit Freisetzung von HB-EGF erfolgen. Alternativ ist auch die Transaktivierung

durch Src unter Beteiligung von Cav-1 beschrieben [15]. Src spielt zudem bei einer Ca^{2+} -induzierten ERK1/2-Phosphorylierung eine Rolle [151] und kann auch unabhängig von einer Transaktivierung des EGFR beteiligt sein [162]. Eine Aktivierung von ERK1/2 über eine Bindung von β -Arrestin kann am AT1R unabhängig von oder zusammen mit G-Proteinen erfolgen [19]. β -Arrestin rekrutiert eine Reihe von weiteren Proteinen, wie z.B. Src, dient aber auch als Gerüst für Raf/MEK/ERK1/2. Die MAPK gehen dabei eine längere Bindung mit β -Arrestin ein, werden so vom Kern abgehalten und phosphorylieren damit bevorzugt zytosolische Substrate. Eine Gq-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 führt hingegen zu einer Phosphorylierung nukleärer (z.B. Transkriptionsfaktoren) und zytosolischer Substrate [121, 153]. β -Arrestin spielt in einer späteren Phase der ERK1/2-Phosphorylierung eine Rolle [17, 153]. Für AngII sind sowohl Ca^{2+} -abhängige Wege unter Beteiligung von PLC/Calmodulin [163], Transaktivierung des EGFR [159] und Aktivierung von Src [151], als auch Ca^{2+} -unabhängige Wege zur Phosphorylierung von ERK1/2 mit Transaktivierung des EGFR [161], teils unter Beteiligung von PKC- δ [157] beschrieben worden. Auch ein Weg über die Gi β -Untereinheit/Tyrosinkinasen (inklusive Src)/Ras und Raf-1 wurde beschrieben [30]. Bei der Phosphorylierung von ERK1/2 durch AngII/AT1R können auch mehrere Wege gleichzeitig beschritten sein [17, 148, 149, 154]. Teils ist der Anteil der Wege vom Ausmaß der Expression des AT1R abhängig [161]. Selbst beim gleichen Zelltyp kann der Weg zur ERK1/2-Phosphorylierung abhängig vom Organ unterschiedlich sein, wie für VSMC gezeigt [162]. Auch abhängig vom betrachteten Wirkzeitpunkt von AngII sind für einen Zelltyp unterschiedliche dominierende Signalwege zu beobachten [15, 151]. Im Zeitverlauf der AngII-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung zeigen sich Unterschiede zwischen den Zelltypen mit einem Abfall auf Hintergrundwerte innerhalb von 30 min [17, 160] oder eine länger anhaltende ERK1/2-Phosphorylierung [160].

Die Signalwege zur Aktivierung von ERK1/2 durch Aldo führen abhängig vom Zelltyp über c-Src und den EGFR, zum Teil auch über die PKC [74, 107]. Auch die Kinetik der ERK1/2-Aktivierung durch Aldo unterscheidet sich je nach Zelllinie [71]. Die Aktivierung von ERK1/2 durch Aldo zeigte sich zum Teil MR-abhängig - wobei dafür die EF-Domänen ausreichend sind, zum Teil wurde aber auch eine Aktivierung über den GPER beschrieben [97, 164]. In renalen Sammelrohrzellen zeigte sich ein mehrphasiger Verlauf der ERK1/2-Aktivierung durch Aldo mit einer PKC- δ -abhängigen Spitze bei 2-5 und einer weiteren Spitze bei 20-30 min sowie eine PKD1-abhängige länger anhaltenden Phase von 60 bis mindestens 120 min. Unter Aldo-Gabe zeigte sich eine physische Assoziation von PKD1 und ERK1/2, wobei die PKD1 für eine Umverteilung von ERK1/2 in den Nukleus nach 2 min und an bestimmte kernnahe zytoplasmatische Lokalisationen nach 30 min sorgt [165]. Eine PKC- und ROS-abhängige Aktivierung von ERK1/2 durch Aldo in Kardiomyozyten führt zu einer Aktivierung von MMP [88]. Über ERK1/2 verstärkt Aldo seine genomische Antwort am GRE, wobei ERK1/2 an der

Translokation des aktivierten MR aus dem Zytoplasma in den Zellkern beteiligt zu sein scheint und die Interaktion von ERK1/2 mit dem MR von der AB-Domäne abhängt [74, 75]. An VSMC vermittelt Aldo abhängig von der PI-3K über ERK1/2 proliferative und vasokonstriktive Wirkungen [84]. In renalen Fibroblasten führt eine ERK1/2-Aktivierung durch Aldo zu einer Steigerung der Expression von Kollagenen [166]. Eine ERK1/2-Aktivierung durch Aldo ist auch an einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} und Aktivierung des NHE und in MDCK-Zellen beteiligt [133, 167].

1.4.4. Beeinflussung des intrazellulären Calciumhaushalts

Als Second Messenger in der Signalgebung beeinflusst intrazelluläres Calcium allgemein die Funktion von Trigger-Proteinen, wie Calmodulin, Pyk2, PLC-Isoformen, PLA_2 und konventionellen PKC-Isoformen, die dann andere Proteine, wie Enzyme, Rezeptoren und Ionenkanäle modulieren. Intrazellulär erfolgt die Ca^{2+} -Speicherung in endoplasmatischem Retikulum (ER) bzw. sarkoplasmatischem Retikulum (SR), welche durch ATP-abhängige Pumpen (SERCA) befüllt werden [168].

Auf die Gabe von AngII erfolgt typischerweise eine zweiphasige Reaktion des intrazellulären Calciums. Zunächst erfolgt ein schneller vorübergehender starker Anstieg, der zum einen auf eine IP_3 -vermittelte Freisetzung über IP_3 -Rezeptoren (IP_3R), zum anderen auf einen Calcium-induzierten Calcium-Release (CICR) über Ryanodinrezeptoren (RyR) aus intrazellulären Speichern zurückzuführen ist [1]. An der Freisetzung von IP_3 durch AngII/AT1R sind dabei Gq- und Tyrosinkinase-vermittelte Wege zur Aktivierung von PLC-Isoformen beteiligt. Die Initialisierung des CICR ist zum einen durch IP_3R -vermittelte Freisetzung von intrazellulärem Calcium, zum anderen durch Einstrom von extrazellulärem Calcium durch TRPC (Transient Receptor Potential Channel) möglich [169, 170]. Auf den initialen Anstieg folgt eine anhaltende Plateauphase, welche durch Einstrom von extrazellulärem Calcium über verschiedene Wege wie Voltage Gated Calcium Channel (VGCC), TRCP sowie eine Umkehr des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) getragen ist [1, 169, 170]. Über eine superoxidvermittelte Stimulation der Bildung von cADPR (Cyclic Adenine Diphosphate Ribose) trägt AngII zudem zu einer Sensitivierung der RyR mit verstärktem CICR bei [169]. Bei kardialen Zellen wurden sowohl positive als auch negative Wirkungen auf die Inotropie beschrieben. Beteiligt scheinen am Herzen PI-3K- und PKC-Isoformen sowie L-Typ-Calciumkanäle [25]. In VSMC erhöht eine Aktivierung von ERK1/2 die Ca^{2+} -Verfügbarkeit und nimmt damit Einfluss auf die Kontraktion [171].

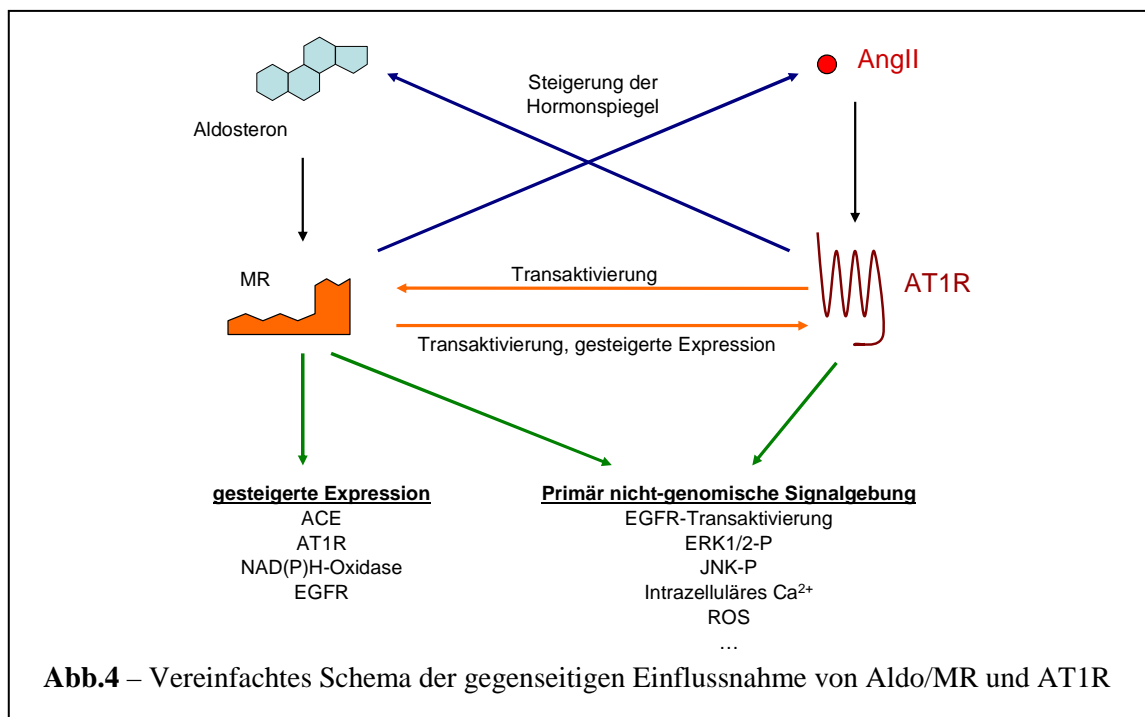
In verschiedenen Epithelzelllinien (M1, T84, Kolonepithel der Ratte) konnte man bei Aldo-Gabe einen schnellen, bei M1-Zellen und Kolonepithel der Ratte von der PKC abhängigen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit anschließendem Plateau beobachten. Dabei scheint von der luminalen Seite einströmendes extrazelluläres Ca^{2+} für die Initiierung einer

Freisetzung aus intrazellulären Speichern eine Rolle zu spielen [112, 113, 172]. In MDCK Zellen konnte gezeigt werden, dass am Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} extrazelluläres Ca^{2+} und eine Aktivierung des EGFR mit nachfolgender ERK1/2-Phosphorylierung beteiligt sind, ein IP_3 -Anstieg konnte nicht festgestellt werden [133, 173].

In VSMC und Endothelzellen wurde ebenfalls ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg durch Aldo beobachtet [174]. Im Gegensatz zu den MDCK-Zellen wurde in VSMC ein Aldo-induzierter schneller Anstieg von IP_3 gesehen [175]. In VSMC zeigte sich die Rolle von extra- und intrazellulärem Calcium in der zeitlichen Abfolge genau entgegengesetzt zu dem bei M1-Zellen: der Anstieg war initial von intrazellulären Speichern, die Bildung des Plateaus dagegen von der Verfügbarkeit von extrazellulärem Calcium abhängig. Eine Hemmung der PLC verhinderte den Ca^{2+} -Anstieg, passend zu einem in VSMC bereits beobachteten Einfluss von Aldo auf die IP_3 -Bildung [175, 176]. In HEK293-Zellen wurde eine reversible Aldo-spezifische Ca^{2+} -Antwort durch Einstrom von extrazellulär unabhängig von der Expression des MR in den Zellen beobachtet [74]. Möglicherweise spielt der MR in dieser Hinsicht keine förderliche Rolle, denn in Hautfibroblasten von MR-Knockout-Mäusen war im Vergleich zum Wildtyp sogar ein stärkerer Aldo-induzierter Ca^{2+} -Anstieg zu verzeichnen [177].

1.5. Interaktion zwischen der MR- und AT1R-Signalkaskade

Einen Überblick über Wechselbeziehungen zwischen AngII/AT1R und Aldo/MR gibt die Abbildung 4. Im Folgenden werden diese im Einzelnen dargestellt.



1.5.1. Gegenseitige Beeinflussung der Hormonspiegel / Rezeptorexpression

AngII sorgt im Rahmen des RAAS in der Nebennierenrinde für eine verstärkte Freisetzung von Aldo. Auch eine erhöhte lokale Aldo-Bildung durch AngII in Abhängigkeit vom AT1R wurde beobachtet [129, 178, 179].

Aldo kann über eine gesteigerte Expression des ACE zu steigenden Spiegeln von AngII führen [90, 180, 181]. Im Rahmen eines Modells der Aldo-induzierten Neovaskularisation nach Ischämie konnte auch eine Steigerung der Angiotensinogen-mRNA beobachtet werden [182].

Aldo steigert zudem die AT1R-mRNA und/oder das AT1R-Protein, z.T. konnte auch eine verminderte Herunterregulierung des AT1R gesehen werden [183-186]. Im AT1aR-Promoter der Ratte wurde ein GRE nachgewiesen [187].

Neben dem AT1R steigert Aldo auch die Expression von wesentlichen Komponenten der AngII-Signalgebung, wie der NAD(P)H-Oxidase und dem EGFR [46, 188], was eine verstärkte Antwort auf AngII zur Folge haben kann.

An dieser Stelle sei auch noch einmal die schon beschriebene Rolle von AngII bei der Erzeugung eines permissiven Milieus für die pathologische Aktivierung des MR erwähnt.

1.5.2. Potenzierung der AngII-Wirkung auf intrazelluläre Signale durch Aldo

Eine Potenzierung der Antwort auf AngII bei gleichzeitiger Gabe von Aldo wurde hinsichtlich intrazellulärer Ca^{2+} -Homöostase, ERK1/2- und JNK-Phosphorylierung, verringerter MKP1- und gesteigerter Ki-Ras2A-Expression, Kontraktion, Proliferation, Zellmigration und Zellalterung gesehen [95, 129-131, 176, 189, 190]. Zum Teil erhöht Aldo dabei auch die Empfindlichkeit der Zellen für AngII, zum Teil war auch die Kombination von für sich alleine unwirksamen Dosen von Aldo und AngII wirksam [129, 130, 176, 190]. In einigen Studien wurde eine Beteiligung von EGFR, c-Src und/oder ROS gesehen [95, 129-131]. Zum Teil wurde ein Einfluss der MR-Blockade auf die potenzierende Wirkung von Aldo beobachtet. Auch eine Beteiligung des GPER wurde beschrieben [95].

Eine entgegengesetzte Wirkung von Aldo auf eine positiv inotrope Wirkung von AngII an humanen atrialen Trabeculae ist beschrieben worden, wobei der negativ inotrope Effekt von Aldo hier von der PKC abhängig zu sein scheint [189].

1.5.3. Effekte von Aldo in Abhängigkeit vom AT1R

Eine Entfaltung der Wirkung von Aldo unabhängig von einer MR-Blockade, aber in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit des AT1R konnte im Zusammenhang mit einer Aldo-induzierten Vasokonstriktion beobachtet werden [191, 192]. Dabei war die Vasokonstriktion von der Aktivierung von intrazellulären Transglutaminasen und nachfolgender Bildung von AT1R-Dimeren abhängig [192]. In einer anderen Studie ergaben sich Hinweise auf eine Transaktivierung des AT1aR durch Aldo mit nachfolgender Phosphorylierung von ERK1/2,

JNK und NF κ B, wobei für letztere auch der MR erforderlich ist. Über den AT1aR scheint Aldo zudem die c-Fos Transkription zu aktivieren [193].

1.5.4. Beteiligung des MR an pathologischen AngII-Effekten

Eine Reihe von Studien zeigt eine Beteiligung von Aldo bzw. des MR an pathologischen Effekten von AngII. So konnte durch eine Blockade des MR oder durch Adrenalectomie bzw. Aldo-Synthase-Hemmung eine Reduktion von AngII-induzierter kardialer Fibrose [194-196], vaskulärer Inflammation [197], Gefäßschädigung [198], NAD(P)H-Oxidase-Aktivität/Expression [188, 198], linksventrikulärer Hypertrophie [199] und der Freisetzung von proinflammatorischem IL-6 [200] erzielt werden. Die Aktivierung des MR durch AngII über den AT1R kann unabhängig von Aldosteron erfolgen [201]. Eine Reduzierung von Schädigungen durch sowohl AT1R- als auch MR-Blockade wurde in einigen Studien gesehen [178, 182, 183].

2. Zielstellung

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stellen in den Industrieländern eine bedeutende Todesursache dar. Standardmäßig werden in der Therapie dieser Erkrankungen unter anderem Medikamente mit Einfluss auf die Bildung bzw. Wirkung des Peptidhormons AngII eingesetzt, welches wiederum ein Teil des RAAS ist, dessen Effektoren letztlich der AT1R und der MR sind. Seit Ende der 1990er Jahre wurde eine Reihe klinischer Studien veröffentlicht, welche einen Zusammenhang zwischen einer Erweiterung der Standardtherapie um zusätzliche Antagonisierung des MR und einer reduzierten Mortalität bzw. Morbidität für Patienten mit Herzinsuffizienz (RALES, EMPHASIS-HF) bzw. Zustand nach Myokardinfarkt (EPHESUS) herstellen, die nicht auf diuretische oder blutdrucksenkende Effekte zurückgeführt werden konnten [49-51, 202] und deren molekularer Mechanismus unklar ist.

Dabei bestehen zwischen Aldo/MR und AngII/AT1R sowohl direkte Wechselwirkungen durch gegenseitige Aktivierung, Expression des Rezeptors oder Freisetzung von Liganden, zum anderen aber auch eine nahezu unüberschaubare Anzahl von gemeinsam bedienten bzw. genutzten Schaltstellen in der zellulären Signalgebung, die in ihrer Vielzahl einen Gegenstand der gegenwärtigen Forschung darstellen. Die Wechselwirkungen von MR und AT1R könnten einen möglichen Baustein der molekularen Mechanismen der pathophysiologischen Wirkung von Aldo/MR darstellen.

Bislang publizierte Forschungsarbeiten geben einige Hinweise auf ein komplexes Netzwerk von Wechselwirkungen zwischen Aldo/MR und AngII/AT1R [203-205], dessen weitere Aufdeckung der Erklärung der beobachteten pharmakologischen Wirkungen durch MR-Antagonisten und möglicherweise der Entwicklung neuer Therapieansätze dienen könnte.

In der vorliegenden Arbeit werden hierzu im heterologen Expressionsmodell mit humanen AT1R und MR in HEK293-Zellen die Wechselwirkungen zwischen dem AT1R und dem MR hinsichtlich der Aktivität am Glukokortikoid-Response-Element (GRE), der Phosphorylierung von ERK1/2 und der kurzfristigen Änderung der intrazellulären Calcium (Ca^{2+})-Konzentration untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Tab.1 - Verwendete Chemikalien (alphabetisch)

Chemikalie	Firma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Steinheim, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aldosteron	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Fluka, Steinheim, Deutschland
Angiotensin II	Sigma, Steinheim, Deutschland
AttoPhos-AP-Lösung	Promega, Mannheim, Deutschland
Bicinchoninsäure (Assay) (BCA, ReagenzA)	Interchim, Montlucon, Frankreich
bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl * 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL Detektionsreagenz 1 (Peroxid-Lösung)	Thermo Scientific, Rockford, USA
ECL Detektionsreagenz 2 (Luminol enhancer Lösung)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Diethylether	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM/Ham's F12-Medium (Dulbecco's modified Eagle Medium)	PAA, Pasching, Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Eisessig (100% Essigsäure)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Fura2	Molecular Probes, Carlsbad, USA
Glucose	Sigma, Steinheim, Deutschland
Glycerol 85%	Uniapotheke, Halle, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefe-Extrakt	Fluka, Steinheim, Deutschland
Immersionsöl	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalium-Dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Homoarginin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl * 6 H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
MolBio-Wasser	Sigma, Steinheim, Deutschland
N', N'-Methylene-Bisacrylamid	Biorad, Hercules, USA
N',N',N',N'-Tetramethylethan-1,2-Diamin (TEMED)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Na-Orthovanadate	Sigma, Steinheim, Deutschland
Na-Pyrophosphat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat	Serva, Heidelberg, Deutschland

(NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O)	
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
o-Phenylenediamine	Sigma, Steinheim, Deutschland
O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid (ONPG)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
PolyFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ponceau-S-Farbstoff	Sigma, Steinheim, Deutschland
Proteasehemmer-Cocktail	Sigma, Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Sigma, Steinheim, Deutschland
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Sulfosalicylsäure	Fluka, Steinheim, Deutschland
Thapsigargin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trizma-Base	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung (0,4%ig)	Fluka, Steinheim, Deutschland
Trypsin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tryptone (Bacto Trypton)	Difco, Detroit, USA
Tween-20	Sigma, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30%ig)	Uniapotheke, Halle, Deutschland
Zitronensäure	Sigma, Steinheim, Deutschland

Tab.2 - Verwendete Kits

Name und Verwendung	Firma
Invisorb Spin Plasmid Mini Two (Plasmidgewinnung)	Invitex, Berlin, Deutschland
Invisorb Plasmid Maxi Kit (Plasmidgewinnung)	Invitex, Berlin, Deutschland
RNeasy Kit (RNA-Isolierung)	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript One-Step-RT-PCR Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tab.3 - Verwendete Primer

Primer gegen... (Gen)	Orientierung	Sequenz (5' – 3')
AGTR1 (humaner AngiotensinII-Rezeptor Typ 1)	Sense	5'-TTGTGGTGGGAATATTTGGAA-3'
	Antisense	5'-TACATAGGTGATTGCCGAAGG-3'

Tab.4 - Verwendete Puffer und Lösungen (alphabetisch)

Puffer	Inhaltsstoffe
Antikörperverdünnungslösung	5% (w/v) BSA in TBS/Tween
Blocking Solution	5% (w/v) Milchpulver in TBS/Tween
10 x Cleavage Buffer	0,6 M Na ₂ HPO ₄ * 7 H ₂ O; 0,4 M NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O; 0,1 M KCl; 0,01 M MgSO ₄ * 7 H ₂ O pH 7
CST-Lyse-Puffer	20 mM Tris (Base), pH7,5; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; Proteasehemmer-Cocktail; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM Na-Orthovanadat; 2,5 mM Na-Pyrophosphat
EDTA-Waschpuffer	0,7 mM EDTA; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
ERK-Lysepuffer	PBS-Puffer als Basispuffer; 0,1 % (v/v) Triton X-100; Proteasehemmer-Cocktail 1:500; 37 mg/l Na-Orthovanadat

HEPES-Ringer (pH 7,4 bei 37°C)	122,5 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,8 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O; 1,2 mM CaCl ₂ * 2 H ₂ O; 1 mM NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O; 5,5 mM Glucose * H ₂ O; 10 mM HEPES; NaOH zur pH-Einstellung
HRP-Substrat	0,5 mg/ml o-Phenylenediamine; 11,8 mg/ml Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O; 7,3 mg/ml Zitronensäure; 0,015 % H ₂ O ₂
Laemmlipuffer (Probenpuffer) 2x	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 10 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 1,2 mM Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM Trizma-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
LB-Medium (pH 7,0)	10 g/l Tryptone; 5 g/l Hefe-Extrakt; 10 g/l NaCl; NaOH zur pH Einstellung
MOPS/Triton Lysepuffer	20 mM MOPS; 0,1% Triton-X-100; pH 7.4
PBS-Puffer	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Pelletpuffer	1 mM EDTA; 1 mM Na-Orthovanadat; Proteasehemmer-Cocktail 1:1000 in PBS
Permeabilisierungspuffer	0,1 % (v/v) Triton X-100; 37 mg/l Na-Orthovanadate; TBS als Basispuffer
10 x Ponceau-S-Lösung	26 mM Ponceau-S-Farbstoff; 1,18 M TCA; 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
SEAP-Puffer	60 mM L-Homoarginin; 3 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM ZnCl ₂ ; 100 mM Tris-HCl (pH 9.3)
10 x TAE-Puffer (pH 8,0)	40 mM Trizma-Base; 1 mM EDTA; 40 mM Eisessig
10 x TBS-Puffer (pH 7,6)	20 mM Trizma-Base; 140 mM NaCl; HCl zur pH-Einstellung
TBS-Tween-Puffer	0,1 % (v/v) Tween-20 in TBS-Puffer
Transferpuffer	25 mM Trizma-Base; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
Trypsin-Lösung	0,1 % (v/v) Trypsin; 0,7 mM EDTA; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O; 1,5 mM KH ₂ PO ₄

Tab.5 - Verwendete Antikörper

	Antigen	Verdünnung	Firma
Erstantikörper	anti-Phospho p44/42 MAP Kinase (aus Kaninchen)	1 : 1.000	Cell Signalling, Danvers, USA
	Anti-HSP90α/β (aus Kaninchen)	1 : 2.000	Santa Cruz, Dallas, USA
Zweitantikörper	anti-Rabbit-HRP-IgG (aus Ziege)	1 : 20.000	Rockland, Gilbertsville, USA

Tab.6 - Verwendete Längenstandards für Gelelektrophorese

	Hersteller
DNA-Ladder	Qiagen, Hilden, Deutschland
Protein-Marker IV peqGOLD	PEQLAB, Erlangen, Deutschland

3.2. Plasmide und Plasmidgewinnung

Die Isolierung der verwendeten Plasmide erfolgte mit Mini- oder Maxi-Prep-Kits nach den Anweisungen des Herstellers aus E.coli-Bakterien, welche das gewünschte Stammplasmid enthalten. Nach dem Auftauen der entsprechenden Bakterien wurden 10 µl der Glycerol-

Bakterienlösung in 5 ml LB-Medium gegeben. Entsprechend dem Resistenzgen auf dem Plasmid wurde zum Zwecke der Selektion Kanamycin (10 µg/ml) oder Ampicillin (60 mg/ml) hinzu gegeben. Die Vermehrung der Bakterien erfolgte im Schüttler bei 37°C über Nacht. Am Folgetag wurden die Bakterien lysiert, die Proteine ausgefällt, abzentrifugiert und letztlich die Plasmide aus dem Überstand an einer Silikamatrix adsorbiert. Anschließend wurden die Plasmide in Wasser eluiert. Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoVue Plus Spektrophotometer (GE Healthcare Europe, München, Deutschland) bestimmt und die gewonnenen Plasmide bei -20°C eingefroren.

Tab.7 - Verwendete Plasmide

Plasmid		Kodiertes Protein
pCMV6-XL4-AT1R	ORIGENE, Rockville, USA	Humaner AT1R (AGTR1)
pEGFP-C1	Clontech, Mountain View, USA	EGFP
pEGFP-C1-hMR	Dr. Farman, INSERM, France	Humaner MR
pSEAP-GRE	Clontech, Mountain View, USA	SEAP
pcDNA1	Invitrogen, Carlsbad, USA	Leerplasmid
pcDNA3.1His-LacZ	Invitrogen, Carlsbad, USA	β-Galaktosidase
pUSE-EGFR	Upstate, Lake Placid, USA	Humaner EGFR

3.3. Zellkultur

Für die durchgeführten Experimente wurden HEK293-Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie, welche durch Transformation einer Primärkultur humaner embryonaler Nierenzellen mit Fragmenten von Adenovirus Typ5 DNA erzeugt wurde [206]. HEK293-Zellen sind gut transfizierbar, weisen keinen funktionell nachweisbaren endogenen MR auf [74] und auch eine endogene AT1R-Expression konnte bei diesem Zelltyp nicht festgestellt werden (siehe Abschnitt 4.1.1.). Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Als Kulturmedium wurde DMEM/Ham's F12 mit 10 % Fetalem Kälberserum (FCS) eingesetzt. Die Zellen wurden 1-2 mal pro Woche subkultiviert. Hierzu wurden die Zellen mit EDTA-Waschpuffer gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in serumhaltigem Medium vereinzelt. Die Zelllösung wurde anschließend zur Ansaat für die Versuche und die weitere Kultivierung verwendet. Die Zellen wurden jeweils 24h vor den Experimenten mit serumfreien Medium synchronisiert.

3.4. Transiente Transfektion

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte nach der Lipofektionsmethode [207] bei ca. 80 % Konfluenz der Zellen unter Einsatz von PolyFect® als Transfektionsreagenz (10 µl/µg Plasmid) mit serumfreiem Medium. Das zugegebene Reagenz gibt der DNA dabei eine kompakte Struktur und bildet mit ihr einen kationischen Komplex, welcher mit Rezeptoren der Zellmembran fusioniert und daraufhin endozytiert wird. Intrazellulär hemmt das Reagenz die Ansäuerung des Lysosoms und damit die lysosomalen Nukleasen und verhindert so den Abbau

der eingebrachten DNA. Die Zellen wurden für ca. 24 h mit dem Transfektionsansatz im Brutschrank inkubiert.

3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Die Darstellung der Lokalisation des EGFP-gekoppelten MR in den transfizierten HEK293-Zellen vor und nach Stimulation mit Aldo erfolgte mittels Biozero 8000 Fluoreszenzmikroskop von Keyence (Osaka, Japan). Die Emission des EGFP wurde dabei nach Anregung mit 488 nm bei einer Wellenlänge von 507 nm gemessen. Die Stimulation und Messung erfolgten in HEPES-Ringer bei 37°C in einer Inkubationskammer von Tokai Hit (Fujinomiya-shi, Japan).

3.6. RT-PCR (Reverse Transkription-PCR)

Zur Vorbereitung wurde zunächst die Gesamt-RNA der Zellen durch einen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren. Im Anschluss erfolgte die Reverse Transkriptions-PCR mit einem SuperScript One-Step-RT-PCR Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit folgenden 25 µl-Ansätzen:

<u>Komponenten</u>	<u>Volumen/25 µl</u>
2X Reaction Mix	12,5 µl
Template RNA	x µl (10 pg –1 µg)
Sense Primer (10 µM)	1 µl
Anti-sense Primer (10 µM)	1 µl
RT/ Platinum. <i>Taq</i> Mix	0.5 µl
Autoclaviertes destilliertes Wasser	auf 25 µl

Im Thermocycler erfolgte zunächst die cDNA-Synthese bei 50°C für 30 min (Anlagerung der Primer und cDNA-Synthese) gefolgt von der Denaturierung der reversen Transkriptase bei 94°C für 2 min. Anschließend erfolgte die PCR-Amplifikation über 35 Zyklen durch Denaturierung der DNA bei 94°C für 0,5 min Anlagerung der Primer bei 58°C für 0,5 min und Elongation bei 72°C für 1 min. Abschließend erfolgte die Elongation noch unfertiger Produkte bei 72°C für 10 min. Die Proben wurden in einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und die Banden unter UV-Licht fotografiert.

3.7. Proteinbiochemische Methoden

3.7.1. Zellinkubation für Western Blot

Die Zellen wurden für die Experimente in 3 cm-Petrischalen angesät. Nach der Transfektions- und anschließender Synchronisationsphase in serumfreien Medium im Brutschrank wurden die Zellen zunächst im Wasserbad bei 37°C mit 1,5 ml HEPES-Ringer unter Zusatz von 1 g/l Glukose für ca. 20 min vorinkubiert. Diese Vorinkubation dient zur Minimierung von möglichen Effekten aus dem Wechsel des Mediumumfelds. Insbesondere sollte ein Stress für die Zellen durch Ansäuerung des Milieus im Nährmedium unter atmosphärischer CO₂-

Konzentration vermieden werden. Die Testsubstanzen wurden für die Inkubationslösungen in glukosehaltigem HEPES-Ringer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Zuordnung der Inkubationslösungen zu den angesäten Petrischalen wurde zufällig festgelegt. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit wurde die Vorinkubationslösung aus der Zellkulturschale abgegossen und anschließend 1,5 ml der zugeordneten Inkubationslösung hinein gegeben. Da Aldosteron und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) in DMSO (Vehikel) gelöst vorliegen, wurde für die Kontrolllösung (Kontrolle) dem glukosehaltigen HEPES-Ringer DMSO in den für die Inkubationslösungen von Aldosteron bzw. PMA verwendeten Mengen zugegeben, wobei eine DMSO-Konzentration von 1:1000 nicht überschritten wurde.

3.7.2. Proteinisolierung

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Inkubationslösungen abgegossen, die Zellkulturschalen mit 1x PBS-Puffer gewaschen und mit Pelletpuffer auf Eis gestellt. Der Pelletpuffer und die Kühlung dienen der Hemmung des Proteinabbaus. Anschließend wurden die Zellen vom Boden gelöst, vereinzelt und aus der Zellkulturschale in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach Abzentrifugation der Zellen und anschließendem Abpipetieren des Überstandes wurden die gewonnenen Pellets in CST-Lysepuffer gelöst und zum Zwecke der Lyse für 30 min auf Eis belassen. Zur Verbesserung des Ergebnisses der Lyse wurden die Proben zwischendurch 30 s im Ultraschallbad behandelt. Nach der folgenden Zentrifugation wurde der Überstand mit den darin enthaltenen gelösten zellulären Proteinen in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.7.3. Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Um eine Vergleichbarkeit der aus den einzelnen Zellkulturschalen gewonnenen Zell-Lysate bezüglich der zugrunde liegenden Zellzahl zu erzielen, wurde der Gesamtproteingehalt der Zell-Lysate mittels BCA-Assay ermittelt. Hierbei reduzieren Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} zu Cu^+ -Ionen, die dann mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bilden. Die Ermittlung des Proteingehalts erfolgte für alle Proben als Doppelbestimmung. Stets wurde eine Eichkurve mit Protein-Standardlösungen und CST-Lysepuffer (Nullwert) mitgemessen. Zur Herstellung des BCA-Reagenz wurden 50 Teile BCA-Komponente A und ein Teil Komponente B (4 % CuSO_4) gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert und im Anschluss die Extinktion bei 560 nm im Multiwell-Reader (Sunrise, Tecan, Deutschland) gemessen.

3.7.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die Zelllysate wurden im Verhältnis 1:1 mit Laemmli Puffer gemischt und für 30 min bei 37°C denaturiert. Das Auftrennen der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (Geräte von Biometra,

Göttingen, Deutschland) in Laufpuffer. Es wurden 12%-ige Polyacrylamid-Trenngele mit vorgeschaltetem 3%-igen Sammelgel verwendet und je Probe regelhaft 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zunächst wurde mit 11 mA für 36 min die Proben konzentriert und anschließend mit 22 mA für 1 h 48 min getrennt. Als Referenz für die Proteingröße wurde ein Proteinmarker mitgeführt.

Nach dem Auftrennen wurden die Proteine als Western Blot unter Verwendung von Transferpuffer im Semi-dry-Verfahren bei 2 mA pro cm² für 48 min aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Nach einem Waschschrift mit 1x TBS wurde die Membran zur Beurteilung der Blot-Qualität mit Ponceau-Lösung angefärbt und fotografiert. Nach Abwaschen der Ponceau-Lösung mit 1x TBS erfolgte die Inkubation der Nitrozellulose-Membran in Blocking Solution auf dem Schüttler für ca. 1 h zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Im Anschluss wurde die Membran in TBS/Tween gewaschen und über Nacht mit dem Erstantikörper in Antikörperverdünnungslösung unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte nach Waschen mit TBS/Tween die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (Horseradish-Peroxidase = HRP)-gekoppelten Zweitantikörper für 2-3 h in Blocking Solution. Nach Waschen mit 1x TBS und Aqua bidest wurde die Detektion mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Verfahren in einem Geldokumentationssystem der Firma Biorad durchgeführt. Hierzu wurde die Membran für 1 min mit Pierce ECL Western Blotting Substrate (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) inkubiert und anschließend die entstehende Chemilumineszenz im noch nicht gesättigten, linearen Bereich detektiert.

Die Detektion und die densitometrische Auswertung der Bilder erfolgten mit der Software Quantity One (Biorad). Als 100%-Bezugswert für die beobachtete Phosphorylierung diente dabei jeweils der Mittelwert der Dichte unter unstimulierten Kontrollbedingungen.

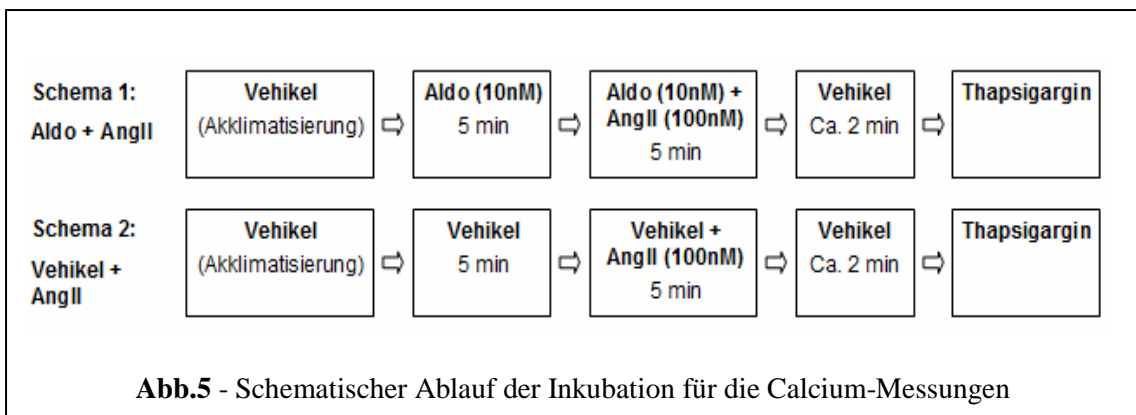
3.8. Messung der intrazellulären Calcium-Konzentration

3.8.1. Prinzip und Versuchsaufbau

Zur Beobachtung der intrazellulären Konzentration freien Calciums wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet. Fura-2 wird als Ester (Fura-2-Acetomethylester = Fura-2-AM) in die Zellen aufgenommen. In der Zelle erfolgt eine Abspaltung des Acetomethyl-Rests durch Esterasen, wonach der Farbstoff die Zellmembran nicht mehr durchdringen kann und intrazellulär verbleibt. Die Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen, wobei unter steigender Calcium-Konzentration die Fluoreszenz bei 334nm Anregungswellenlänge zu-, bei 380 nm dagegen abnimmt. Der Quotient $\text{Fluoreszenz}_{334\text{nm}}/\text{Fluoreszenz}_{380\text{nm}}$ („Ratio“) lässt somit Rückschlüsse auf den Verlauf der intrazellulären Calcium-Konzentration zu.

Für die Versuche wurden HEK293-Zellen mit dem MR und dem AT1R transfiziert, nach 24 h abgelöst und auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen dünn angesät. Nach einer 24 h-

Wachstumsphase wurden die Zellen für 24 h mit serumfreien Medium synchronisiert. Die Deckgläschen wurden 30 min vor der Messung mit Fura-2-AM bei 37°C und Dunkelheit im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationslösungen wurden wie unter Abschnitt 3.7.1. beschrieben hergestellt und vor dem Einströmen auf 37°C vorgewärmt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Axiovert 100 TV Mikroskop (400fache Vergrößerung, Ölimmersion, Zeiss; automatischer Filterwechsler von Hamamatsu) alle 10 Sekunden mit einer Belichtungszeit von jeweils 556 ms. Zu Beginn der Messung wurden die Zellen mit Kontrolllösung (HEPES+Glucose mit Vehikel) überströmt und mittels Okular ein geeigneter Bereich mit möglichst zytosolreichen, klar abgrenzbaren Zellen aufgesucht. Je nach Ausschnitt wurden 8 bis 18 Zellen als „regions of interest“ für die automatisierte Auswertung und grafische Darstellung der Fluoreszenz durch die Software „Aquacosmos“ (Hamamatsu) markiert. Nach einer Akklimatisierungsphase wurde mit dem Ablaufschema begonnen (siehe Abb.5).

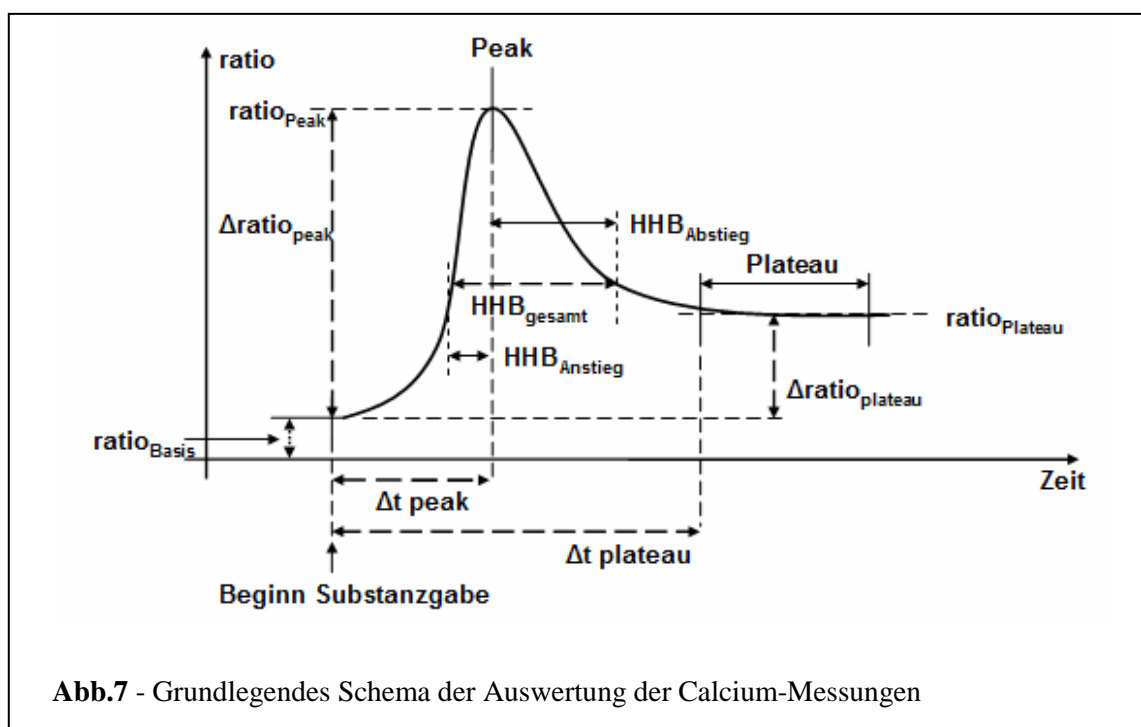
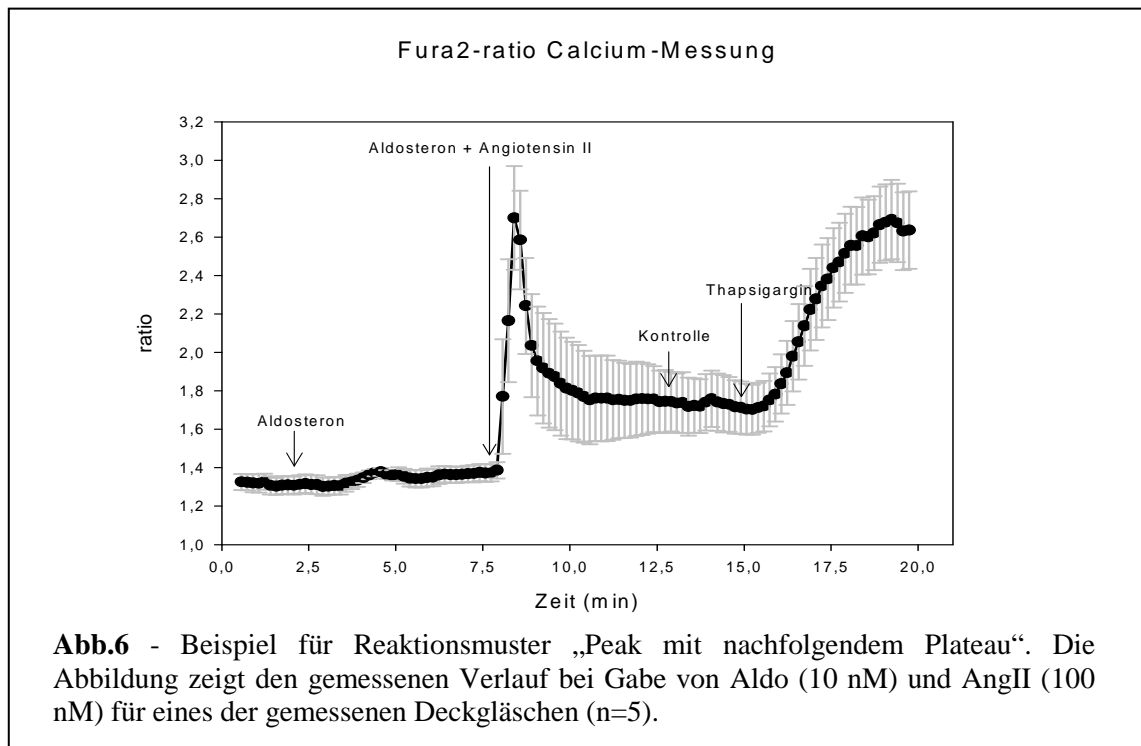


Thapsigargin-Lösung diente zur Kontrolle der korrekten Messung im Bereich des Zytosols und der Reaktionsfähigkeit der Zellen. Thapsigargin hemmt in hohem Maße die Ca^{2+} -ATPase (SERCA) der intrazellulären Calciumspeicher, also des endoplasmatischen Retikulums (ER), und verhindert somit den Rücktransport von Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in das Speicherlumen [208]. In der Folge kommt es hierdurch zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration.

3.8.2. Auswertungsschema

Bei der Reaktion auf AngII wurde zwischen den Formen „Peak“, „Peak mit nachfolgendem Plateau“ und „Plateau“ unterschieden. Bei einem „Peak“ handelt es sich um einen steilen Anstieg auf einen Maximalwert mit anschließendem Abfall auf das Ausgangsniveau oder auf ein höheres, annähernd konstantes Niveau („Peak mit nachfolgendem Plateau“, siehe Beispiel Abb.6). Ein Peak bedeutet eine schnelle Freisetzung von Calcium-Ionen in das Zytosol. Bei einem Plateau kommt es dagegen zu einem langsameren Anstieg der Calcium-Konzentration auf ein für einige Belichtungen anhaltendes annähernd gleiches Niveau. Der Mittelwert der letzten 10 Messungen vor Beginn der Gabe einer Inkubationslösung wurde als Ausgangsniveau

für die nachfolgend beobachtete Reaktion ($ratio_{Basis}$) zu Grunde gelegt. Als signifikante Reaktion wurde jeweils ein Anstieg der Ratio um mindestens den 4-fachen Wert der Standardabweichung des Ausgangsniveaus definiert.



Es wurde sowohl die absolute Veränderung der Ratio ($\Delta ratio_{peak}$ bzw. $\Delta ratio_{plateau}$), als auch die jeweilige relative Veränderung der Ratio ($rel. ratio_{peak}$ bzw. $rel. ratio_{plateau}$) betrachtet:

$$\Delta ratio_{peak} = ratio_{peak} - ratio_{Basis}$$

$$rel. ratio_{peak} = ratio_{peak} / ratio_{Basis}$$

Entsprechend wurde auch für das Plateau berechnet. Zudem wurden die Zeit bis zum Peak (Δt_{peak}) bzw. die Zeit bis zum Erreichen eines Plateaus ($\Delta t_{\text{plateau}}$) ausgewertet.

Zur weiteren Charakterisierung der Peaks wurde die Form der Peak-Zacke durch die Betrachtung der Breite in der halben Höhe (HHB) beurteilt (siehe Abb.7).

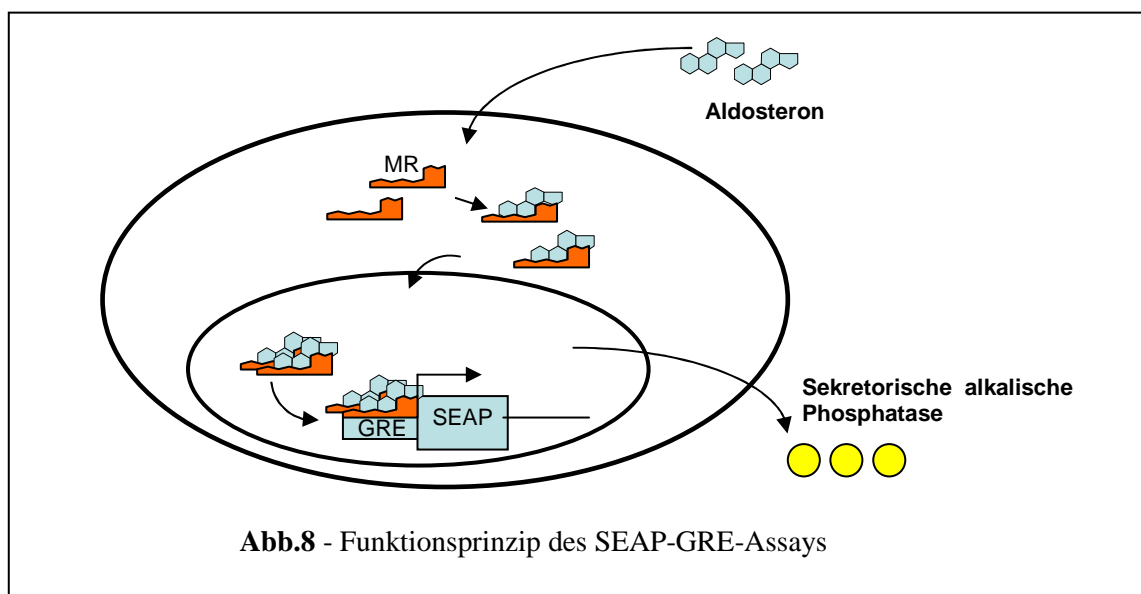
3.9. Reporter-Gen-Assays

3.9.1. Transfektion und Inkubation

Die Transfektion der HEK-293-Zellen für die Versuche zur Bestimmung der Aktivität am GRE erfolgte wie in 3.4. beschrieben. Hierbei wurden 24-Well-Platten verwendet. Es wurden stets das Plasmid für das Reportergen (pSEAP-GRE), die Transfektionskontrolle (pcDNA3.1His-LacZ) und die Expressionsplasmide für die Rezeptoren (pEGFP-C1-hMR und pCMV6-XL4-AT1R) bzw. der Leervektor transfiziert. Nach der Transfektion folgten 24 h als Synchronisationsphase in serumfreiem Medium. Die Inkubation erfolgte für 24 h mit im serumfreien Medium gelösten Testsubstanzen (AngII, Aldo, Vehikel). Im Anschluss wurden die Zellen und das Medium wie weiter unten beschrieben für die Assays verwendet.

3.9.2. SEAP-GRE-Assay

Um die Transaktivierungsaktivität des MR am Glukokortikoid-Response-Element (GRE) zu bestimmen, wurde ein Konstrukt verwendet, bei dem am 5'-Ende der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) ein GRE vorhanden ist. Erfolgt die Transaktivierung des GRE durch den ligandengebundenen MR, so wird vermehrt SEAP in den Zellen exprimiert. Die SEAP wird von den Zellen ins Medium sezerniert, wo ihre Aktivität und damit das Ausmaß ihrer Expression durch Messung der Fluoreszenz ihres Reaktionsprodukts nach Zugabe eines geeigneten Substrats als Steigung gemessen werden kann (siehe Abb.8).



Die Expression von SEAP korreliert mit der MR-induzierten Transaktivierung am GRE. Die Aktivität der SEAP wurde aus dem Medium der Zellen bestimmt. Zunächst wurde das Probenmedium 1:1 mit SEAP-Puffer gemischt, für 30 min bei 65°C erhitzt um die Aktivität unspezifischer Phosphatasen zu minimieren, kurz auf Eis gestellt und anschließend mit Substrat (AttoPhos-Kit) gemischt. Hierbei entsteht durch die SEAP ein fluoreszierendes Produkt, dass mit dem Multiwell-Counter bei einer Anregungswellenlänge von 440 nm und einer Emissionswellenlänge von 560 nm gemessen wird.

3.9.3. β -Galaktosidase-Assay

Die β -Galaktosidase bewirkt unter Zugabe von O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) eine enzymatische Reaktion mit Bildung des gelbfarbenen O-Nitrophenol. Da die Aktivität der β -Galaktosidase von der Zahl der transfizierten Zellen im betreffenden Well abhängt und man davon ausgehen kann, dass eine Zelle entweder alle oder kein Plasmid aufnimmt, kann man mit Hilfe der Bestimmung der Aktivität der β -Galaktosidase die Werte für die SEAP-Aktivität der einzelnen Wells im Versuch hinsichtlich der Transfektionseffizienz und der Zellzahl normieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in MOPS/Triton-Lysepuffer lysiert und vom Boden der Wells gelöst. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in Mikroreaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden mit 1x Cleavage-Puffer und ONPG für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit Stop-Puffer (1 M Natriumcarbonat) beendet und die Extinktion bei 405 nm gemessen.

3.10. Statistik und verwendete Software

Für die Auswertung und Darstellung der Rohdaten wurden Microsoft Office XP und SigmaPlot 8.0 verwendet. Für die Erfassung der ECL-Entwicklung der Western Blots und die anschließende densitometrische Auswertung fand die Software QuantityOne Anwendung. Für die Ca^{2+} -Messungen wurde die Software Aquacosmos verwendet.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Zur Testung der Signifikanz im Unterschied zweier Ergebnisse wurde der gepaarte oder ungepaarte Student t-Test verwendet. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ zugrunde gelegt. Die Versuche einer Reihe wurden mit verschiedenen Passagen durchgeführt. Die Anzahl der in den Versuchen insgesamt benutzten Zellen (Calcium-Messung), Zellschalen (Western Blot) oder Wells (SEAP-GRE) wird mit „n“ bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Aufbau des Modells

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen in der Signaltransduktion von Aldo/MR und AngII/AT1R sind an das Zellmodell zwei wesentliche Anforderungen zu stellen: Zum einen soll die An- und Abwesenheit des jeweiligen Rezeptors kontrolliert steuerbar sein. Zum anderen muss die An- und Abwesenheit des jeweiligen Liganden kontrolliert steuerbar sein. Die Anforderung im Hinblick auf die Liganden ist über die geeignete Bereitstellung von Testlösungen in den Versuchen einfach zu erfüllen, da für HEK293-Zellen weder eine Aldosteron-, noch ein AngII-Sekretion bekannt sind. Wie bereits beschrieben, ist für HEK293-Zellen auch keine Expression des MR oder AT1R bekannt.

4.1.1. Expression des MR und des AT1R

Die Expression des verwendeten EGFP-C1-hMR wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Hierbei zeigten die mit dem EGFP-C1-hMR transient transfizierten HEK293-Zellen bedingt durch die Kopplung des MR mit EGFP eine deutliche Grünfärbung des Zytoplasmas mit Aussparung der Zellkerne. Bei Gabe von Aldosteron translozieren die stimulierten MR in den Zellkern, der sich grün anfärbt. Die grüne Fluoreszenz des Zytoplasmas wird im Gegenzug stark vermindert (siehe Abb.9).

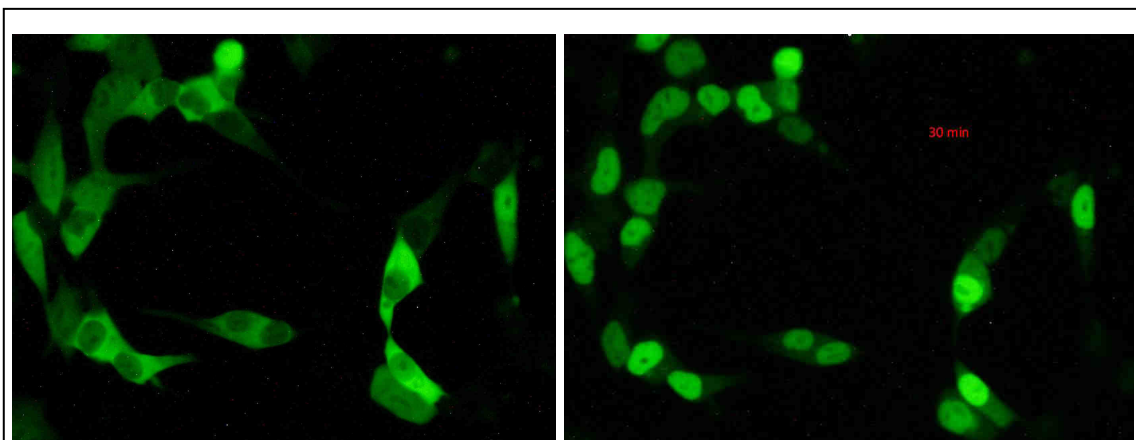


Abb.9 – Nachweis der Expression des EGFP-C1-MR durch Fluoreszenzmikroskopie. Auf der linken Seite sieht man eine deutliche grüne Fluoreszenz des Zytoplasmas, welche die Expression des EGFP in den transfizierten HEK293-Zellen anzeigt. Auf der rechten Seite sieht man unter der Gabe von Aldo (10 nM) eine Wanderung des EGFP in den Kern aufgrund der Kopplung mit dem MR (Aufnahme nach 30 min Stimulation).

Die Expression des humanen AT1R wurde durch reverse Transkription-PCR nachgewiesen. Bei den mit dem AT1R-Plasmid transfizierten HEK293-Zellen konnte in der nachfolgenden Gelelektrophorese eine deutliche Bande im Bereich der erwarteten Höhe (189 Basenpaare (bp) für den verwendeten humanen AT1R) beobachtet werden (siehe Abb.10). Bei den zur Kontrolle untersuchten nativen HEK293-Zellen zeigte sich dagegen diese Bande nicht.

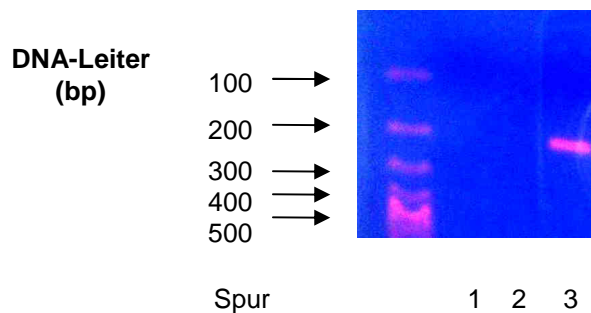


Abb.10 - Gelelektrophorese des PCR-Produkts der reversen Transkription. In mit dem humanen AT1R transfizierten HEK293-Zellen (Spur 3) zeigt sich eine Bande im Bereich der erwarteten DNA-Länge (189 bp), der folglich exprimiert wird. In den Spuren 1 (Wasser) und 2 (native HEK293-Zellen) zeigt sich erwartungsgemäß keine Bande.

4.1.2. Funktionsfähigkeit des MR und des AT1R

Die Funktionsfähigkeit des verwendeten MR-Plasmids zeigte sich im SEAP-GRE-Assay durch seine Aktivität am entsprechenden Promotor unter Gabe von Aldosteron. Diese Aktivität ist bei den EGFP-C1-MR-transfizierten Zellen zu beobachten, nicht jedoch bei den nicht transfizierten (siehe hierzu den Abschnitt 4.4.1.). In Versuchen in unserem Labor wurde schon früher gezeigt, dass zwischen der Aktivität des EGFP-MR am GRE im Vergleich zur Aktivität des MR ohne EGFP-Tag kein Unterschied zu beobachten war.

Der Nachweis der Funktionsfähigkeit für das verwendete AT1R-Plasmid konnte zum einen durch die charakteristische Modulation des intrazellulären Calciums als Reaktion auf die Gabe von AngII in den diesbezüglichen Versuchen (siehe Abschnitt 3.8.2. Abb.6) erbracht werden. Zum anderen konnte eine Wirkung auf die ERK1/2-Phosphorylierung nach Gabe von AngII nur bei den AT1R-transfizierten HEK293-Zellen, nicht jedoch bei Abwesenheit des AT1R beobachtet werden (siehe hierzu den Abschnitt 4.2.4.).

4.2. Betrachtung der Phosphorylierung von ERK1/2

Das Ausmaß der ERK1/2-Phosphorylierung unter verschiedenen Bedingungen wurde im Folgenden mittels Western Blot untersucht.

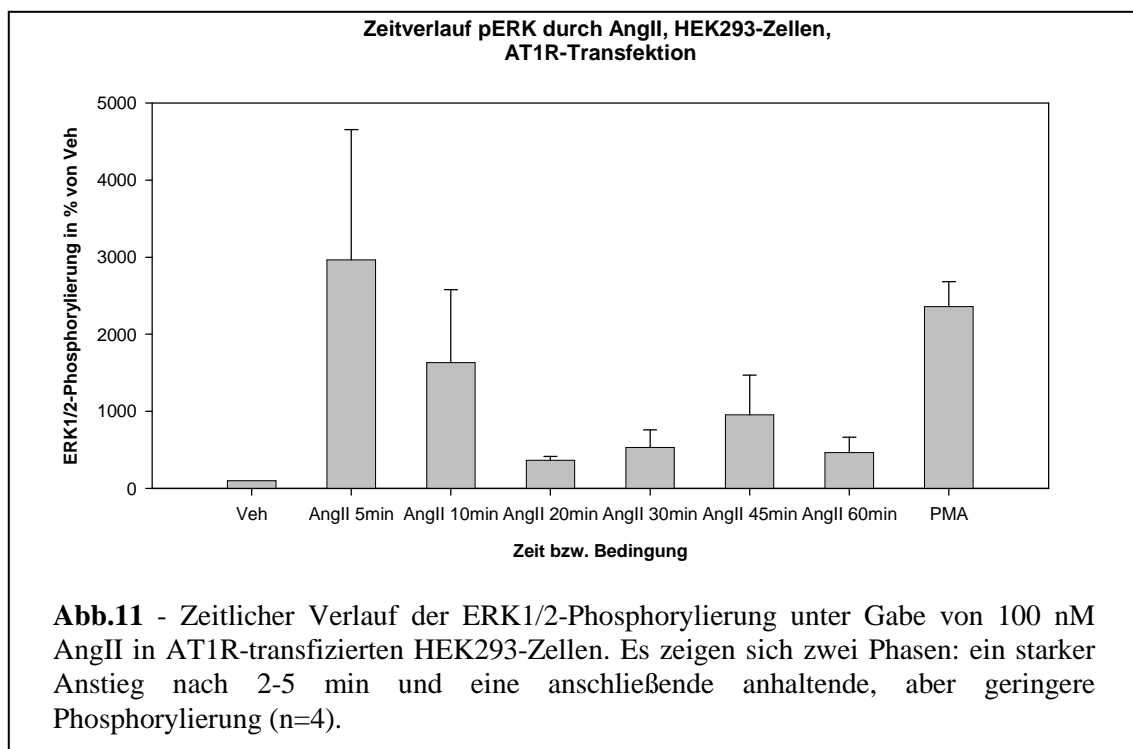
4.2.1. Kontrollbedingungen

Als Positivkontrolle wurde in den Versuchen 1 μ M Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) eingesetzt. PMA bindet und aktiviert die PKC und führt dadurch zu einer starken

Phosphorylierung von ERK1/2. Eine deutliche Reaktion auf die Gabe von PMA weist die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Zellen hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK1/2 nach. Zum anderen wurde als Kontrolle im Sinne des unstimulierten Zustandes die HEPES-Trägerlösung (+ 1mg/ml Glucose) unter Zusatz der in den Versuchslösungen vorliegenden DMSO-Lösungsmittelmenge (Vehikel = Veh) genutzt (max. DMSO-Konzentration 1:1000).

4.2.2. Variation der Inkubationsdauer

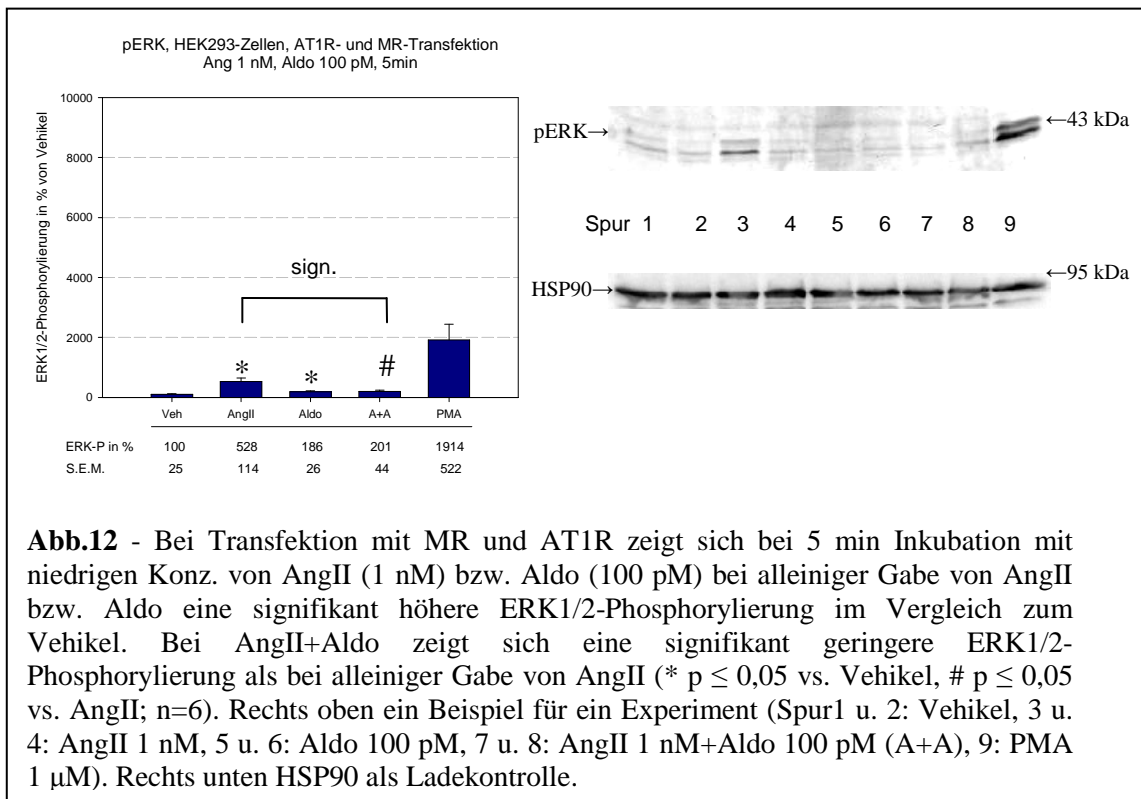
In Vorversuchen wurde der zeitliche Verlauf der ERK1/2-Phosphorylierung unter separater Gabe von Aldosteron bzw. Angiotensin II in den HEK293-Zellen untersucht. Hierbei ergaben sich für die Gabe von AngII in einer Konzentration von 100 nM Hinweise auf einen biphasischen Verlauf (siehe Abb.11). Die erste Phase ist durch eine schnelle starke Phosphorylierung von ERK1/2 gekennzeichnet, welche ihr Maximum bei ca. 2-5 min Inkubationsdauer erreicht. In der zweiten Phase ist eine geringere, aber anhaltende Phosphorylierung von ERK1/2 zu beobachten. Zur Abbildung dieser zweiphasigen Reaktion wurde für die folgende Versuchsreihe als repräsentative Inkubationszeiten für die erste Phase eine Inkubationsdauer von 5 min und für die zweite Phase von 30 min festgelegt.



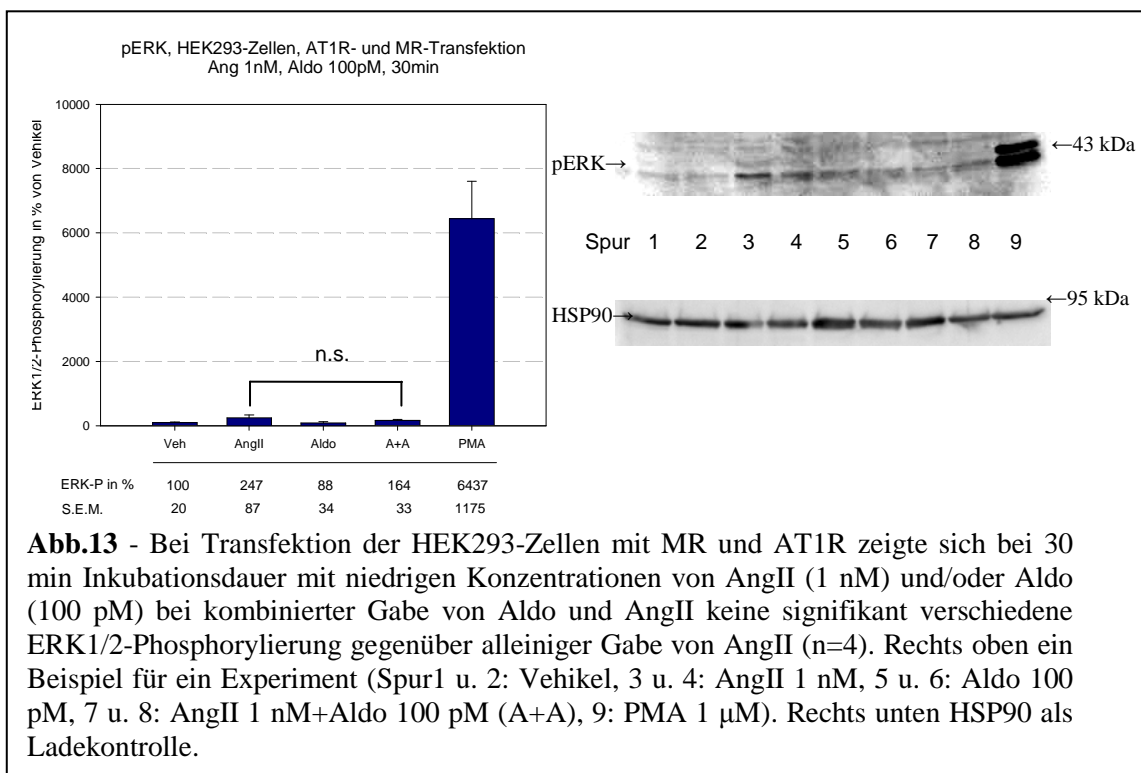
4.2.3. ERK1/2-Phosphorylierung bei Anwesenheit von MR und AT1R

Im Folgenden wurden Versuche mit AT1R- und MR-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Die Versuche wurden zunächst mit zwei unterschiedlichen Konzentrationsstufen, einer mit niedrigen und einer mit höheren Konzentrationen von Aldo und AngII durchgeführt. Die Stufe mit niedrigen Konzentrationen von 1 nM AngII und 100 pM Aldo kann als Abbildung der physiologischen Bedingungen betrachtet werden. Die Stufe der höheren Konzentrationen

von 100 nM AngII und 10 nM Aldo kann dagegen ein Modell für pathophysiologische Bedingungen darstellen. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz sind Aldo-Konzentrationen von 10 nM und mehr im kardialen Gewebe bzw. im Blutplasma berichtet worden [189, 209].



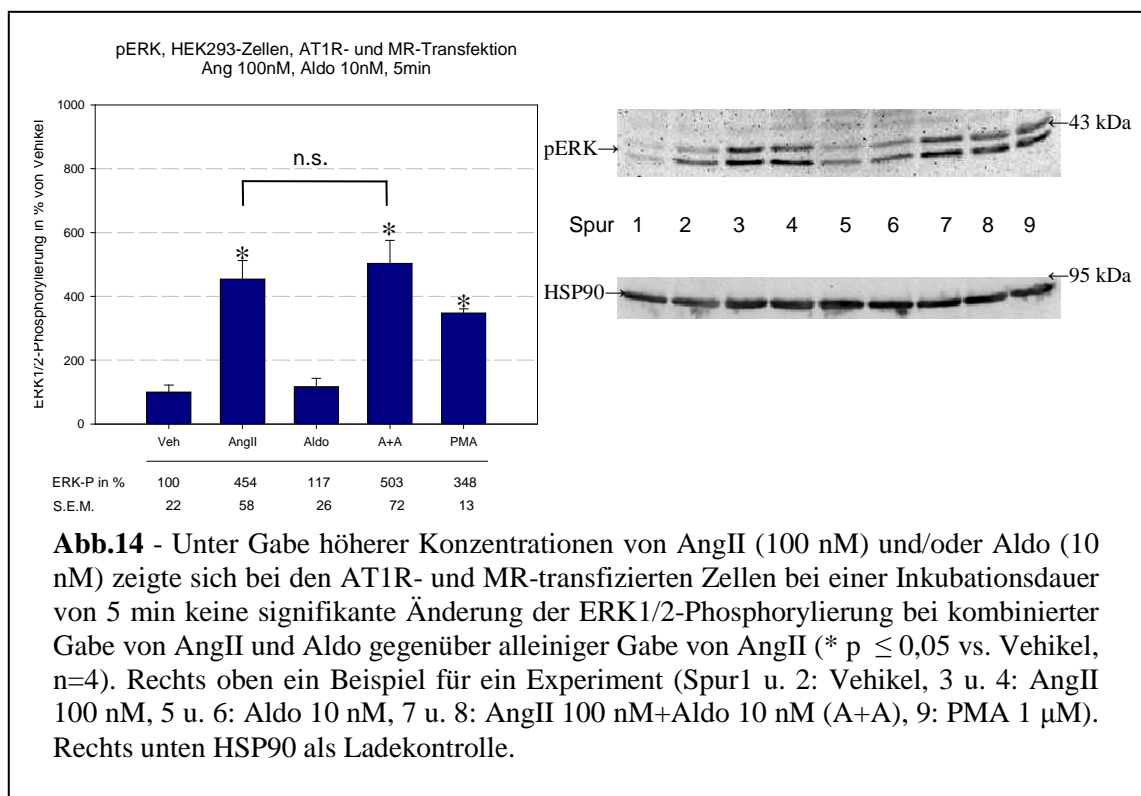
Bei Gabe niedriger Konzentrationen von AngII (1 nM) bzw. Aldo (100 pM) zeigte sich hierbei bei einer Inkubationsdauer von 5 min ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von



ERK1/2 durch separate Gabe von AngII bzw. Aldo gegenüber dem Vehikel. Zudem zeigte sich eine signifikant geringere ERK-Phosphorylierung durch die Kombination AngII/Aldo als durch AngII alleine (siehe Abb.12). Insgesamt waren die Banden sehr schwach.

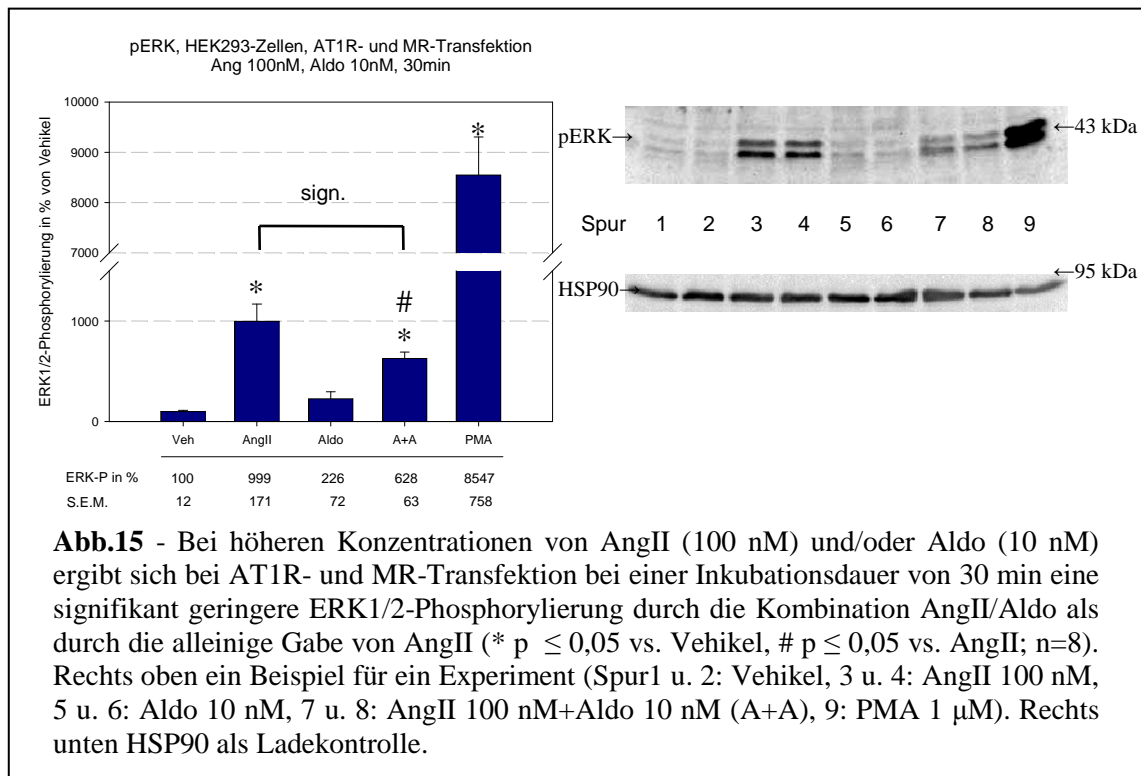
Bei einer Inkubationsdauer von 30 min und Gabe der niedrigen Konzentrationen zeigte sich keine signifikante Zunahme der ERK1/2-Phosphorylierung im Vergleich zum Vehikel. Es zeigte sich insbesondere auch kein Trend hin zu einer Potenzierung der ERK1/2-phosphorylierende Wirkung von Angiotensin II durch zusätzliche Gabe von Aldosteron. Insgesamt heben sich die Banden unter diesen Bedingungen kaum vom Hintergrund der entwickelten Blot-Membranen ab (siehe Abb.13).

Bei der Gabe der höheren Konzentrationen von Angiotensin II (100 nM) bzw. Aldosteron (10 nM) konnte bei einer Inkubationsdauer von 5 min ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 gegenüber dem Vehikel durch Gabe von Angiotensin II, durch die Kombination AngII/Aldo und durch PMA beobachtet werden. Die ERK1/2-Phosphorylierung durch die kombinierte Gabe von Angiotensin II und Aldosteron bewegte sich dabei in etwa auf dem gleichen Niveau wie die durch Angiotensin II alleine (503% vs. 454%, $p=0,658$; siehe Abb.14).



Auch für die Gabe der höheren Konzentrationen und eine Inkubationsdauer von 30 min ergab sich ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 gegenüber dem Vehikel durch Angiotensin II, durch die Kombination AngII/Aldo und durch PMA.

Die Kombination von Angiotensin II und Aldosteron zeigte allerdings bei 30 min eine signifikant geringere ERK1/2-phosphorylierende Wirkung als die alleinige Gabe von Angiotensin II (628% vs. 999%, siehe Abb.15).

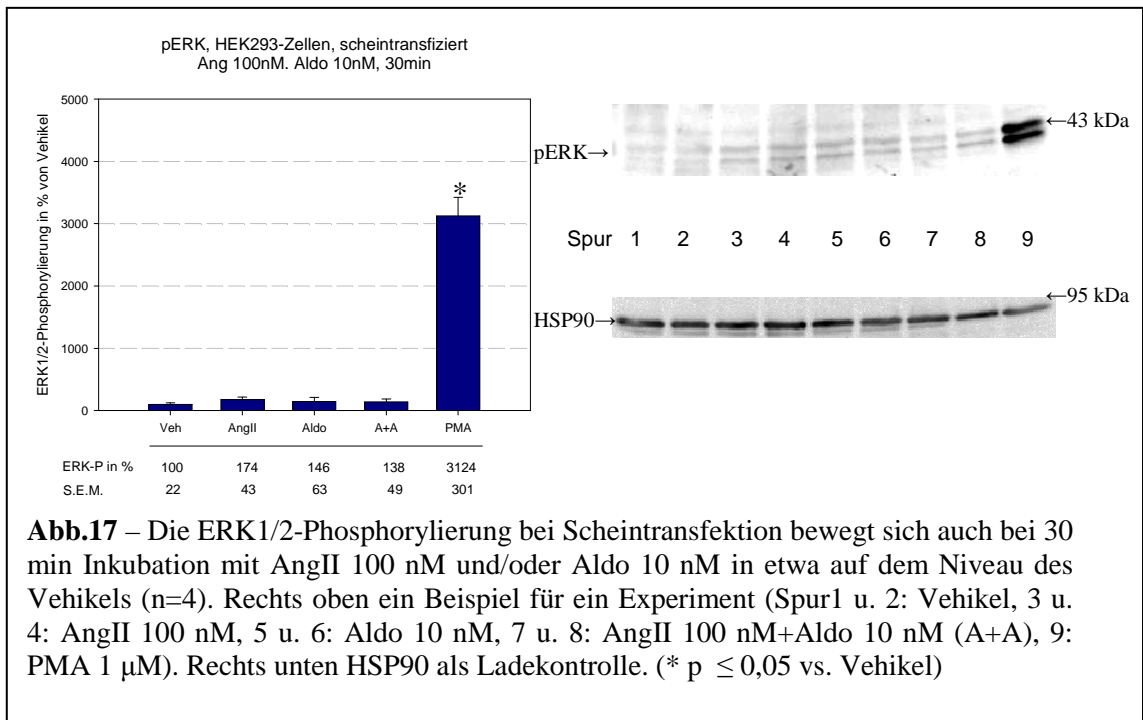
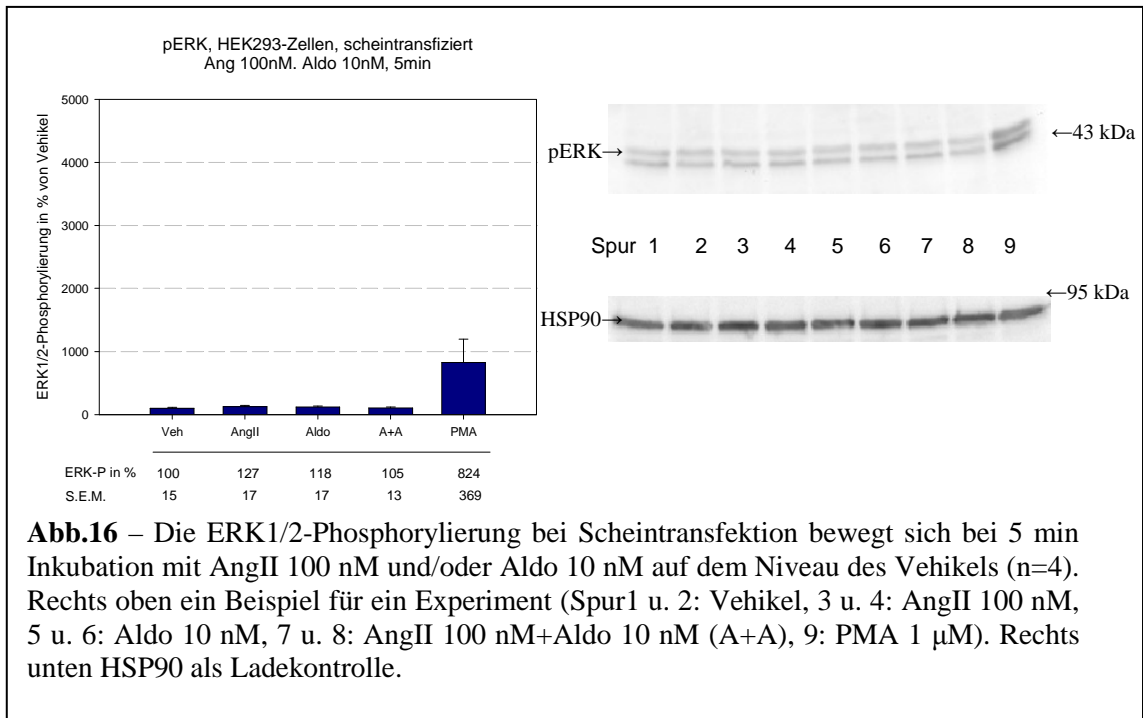


4.2.4. ERK1/2-Phosphorylierung bei Abwesenheit des MR und AT1R

Um zu überprüfen, ob die Phosphorylierung von ERK1/2 durch Angiotensin II bzw. Aldosteron tatsächlich von der Anwesenheit der entsprechenden Rezeptoren, also des AT1R und der MR abhängt, wurden Versuche mit scheintransfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Bei der Scheintransfektion wurden alle Arbeitsschritte der Transfektion durchgeführt, jedoch ohne die Zugabe eines Plasmids zum Transfektionsansatz.

Für die Versuche mit den scheintransfizierten Zellen wurden hohe Konzentrationen von Angiotensin II (100 nM) und/oder Aldosteron (10 nM) eingesetzt unter der Annahme, dass eine eventuell mögliche Steigerung der Phosphorylierung von ERK1/2 in Abwesenheit der eigentlichen Rezeptoren am ehesten noch durch Gabe hoher als durch niedrige Konzentrationen der Substanzen erzielt werden kann.

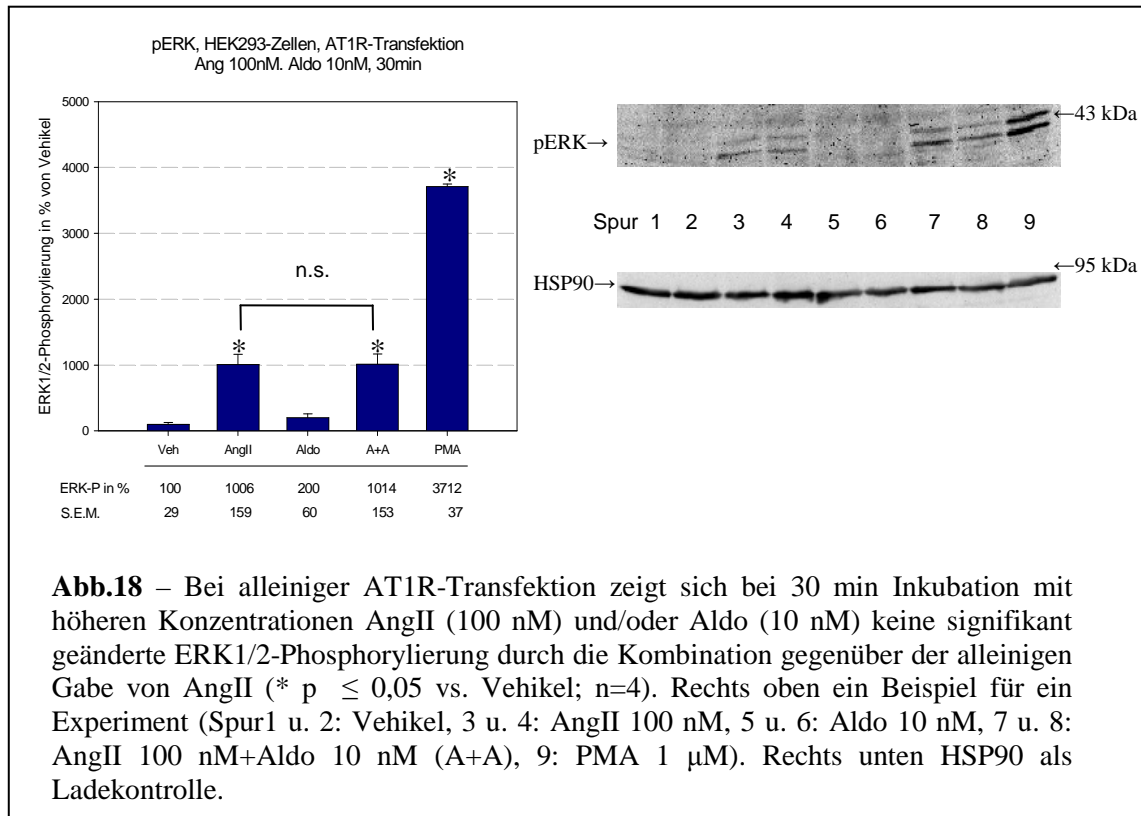
Im Western Blot zeigte sich für die Gabe dieser höheren Konzentrationen von Angiotensin II bzw. Aldosteron sowohl bei einer Inkubationsdauer von 5 min als auch von 30 min keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung von ERK1/2 durch AngII, Aldo oder ihre Kombination im Vergleich mit dem Vehikel. Die Phosphorylierung bewegte sich in etwa auf dem Niveau des Vehikels (siehe Abb.16 u. 17). Somit kann gefolgert werden, dass die ERK1/2-Phosphorylierung durch die Gabe von AngII, Aldo und deren Kombination an die Anwesenheit ihrer Rezeptoren gebunden ist.



4.2.5. ERK1/2-Phosphorylierung bei alleiniger Anwesenheit von AT1R

Es wurden weitere Experimente durchgeführt, um den bei der Inkubationsdauer von 30 min mit Gabe der höheren Konzentrationen beobachteten hemmenden Effekt der Gabe von Aldosteron auf die ERK1/2-phosphorylierende Wirkung von Angiotensin II weiter zu untersuchen.

Zunächst stellt sich die Frage, ob die beobachtete Reduzierung der durch Angiotensin II induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 durch die gleichzeitige Gabe von Aldosteron an die Verfügbarkeit des MR gebunden ist.

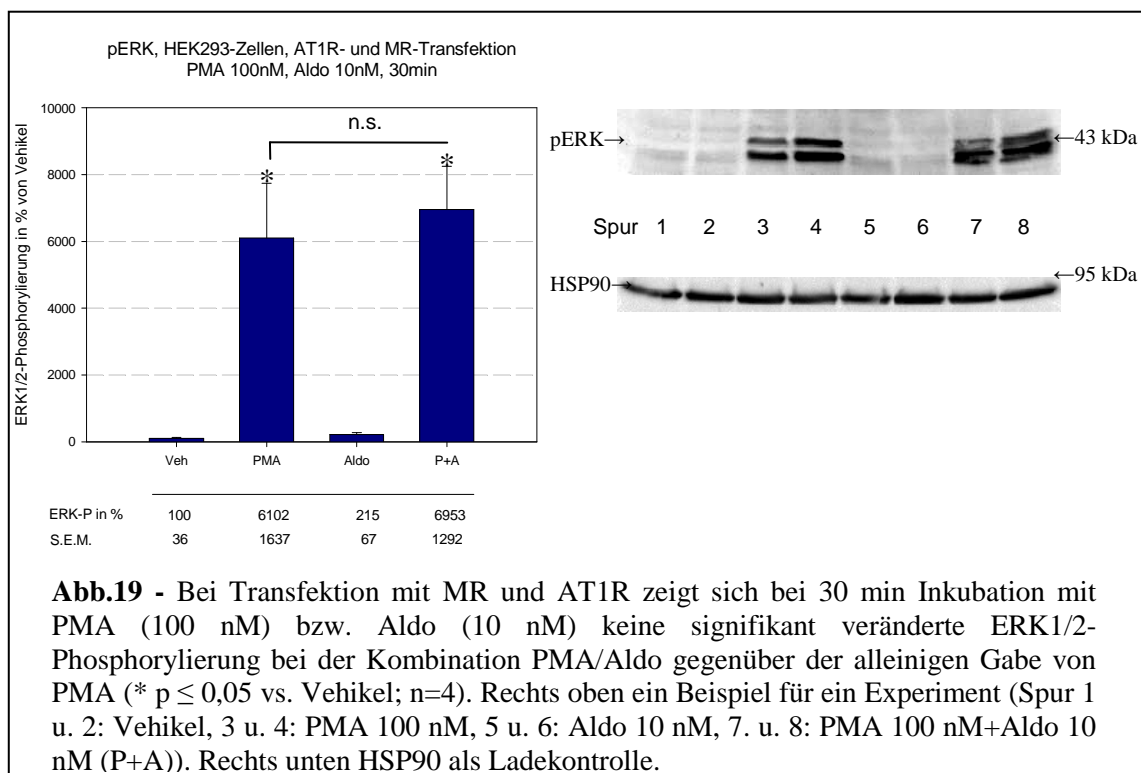


Hierzu wurden Versuche mit HEK293-Zellen durchgeführt, welche nur mit dem AT1R transfiziert wurden. Hierbei zeigte sich jeweils ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 gegenüber dem Vehikel durch Angiotensin II, durch die Kombination von AngII/Aldo und durch PMA. Im Gegensatz zu den Versuchen bei Anwesenheit beider Rezeptoren konnte für die Kombination Angiotensin II/Aldosteron in Abwesenheit des MR keine signifikant veränderte ERK1/2-phosphorylierende Wirkung im Vergleich zur alleinigen Gabe von AngII (1014% vs. 1006%, $p=0,489$) festgestellt werden (siehe Abb.18). Daraus ist zu folgern, dass die beobachtete hemmende Wirkung der Gabe von Aldosteron auf die durch AngII induzierte ERK1/2-Phosphorylierung an die Verfügbarkeit des MR gebunden ist.

4.2.6. ERK1/2-Phosphorylierung durch PMA bei Anwesenheit von MR und AT1R

Zur Beantwortung der Frage, ob Aldosteron seinen Einfluss über den MR eher auf einer der PKC-Aktivierung vor- oder nachgelagerten Stufen der AngII-induzierten ERK1/2-

Phosphorylierung ausübt, wurden die mit dem MR und dem AT1R transfizierten HEK293-Zellen mit PMA (100 nM) und der Kombination von PMA (100 nM) und Aldosteron (10 nM) inkubiert und die dabei jeweils erzielte ERK1/2-Phosphorylierung miteinander verglichen. Es ergab sich ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 gegenüber dem Vehikel sowohl durch die separate Gabe von PMA als auch durch die Kombination von PMA und Aldosteron. Ein hemmender Effekt der zusätzlichen Gabe von Aldosteron auf die durch PMA induzierte ERK1/2-Phosphorylierung konnte nicht beobachtet werden (PMA 6102%, PMA und Aldosteron 6953%, $p=0,736$; siehe Abb.19).



Aldosteron übt seinen hemmenden Einfluss über den MR auf die AngII-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 somit eher nicht auf einer der PKC-Aktivierung nachgelagerten Ebene aus.

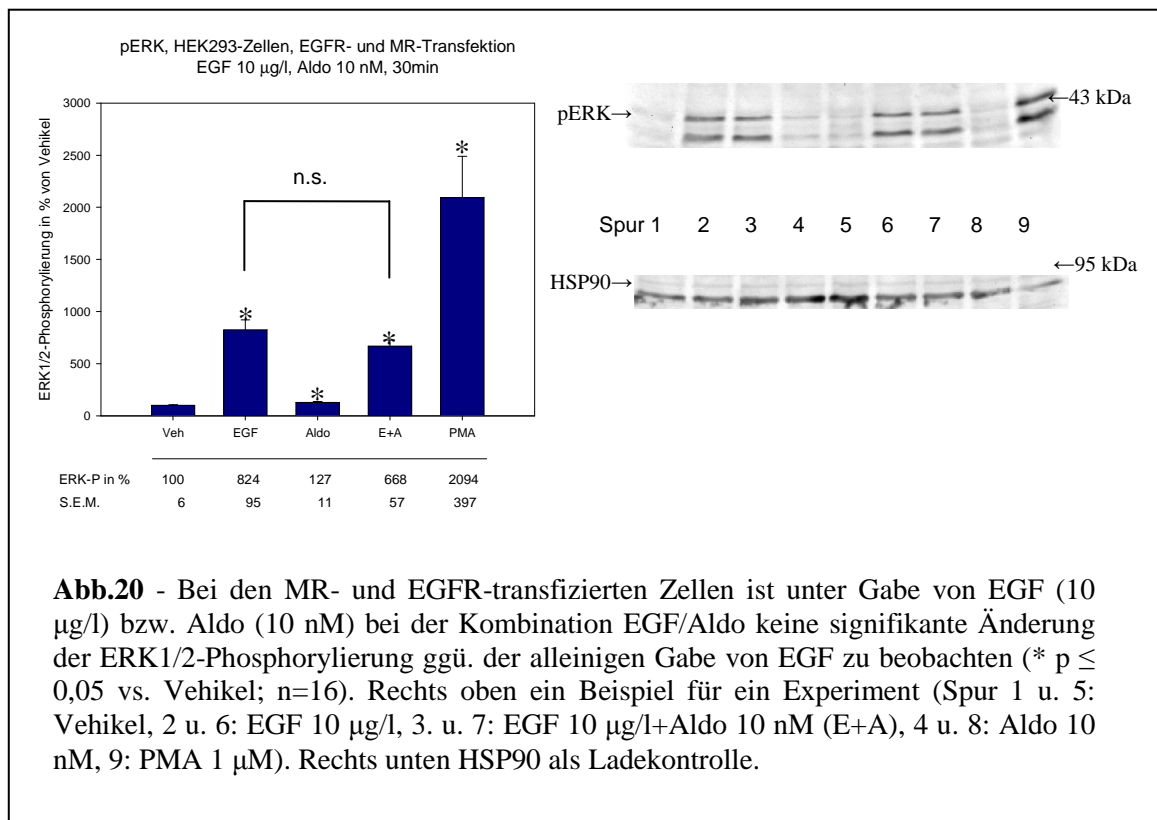
4.2.7. ERK1/2-Phosphorylierung durch EGF bei Anwesenheit von MR und EGFR

Die Transaktivierung des EGFR stellt, wie in der Einleitung erwähnt, einen wesentlichen Weg für die Entfaltung der ERK1/2-phosphorylierenden Wirkung von AngII dar.

An dieser Stelle bietet sich eine andere Möglichkeit, über die Aldosteron über den MR Einfluss auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung nehmen könnte. Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses auf den EGFR bzw. diesem nachgelagerte Signalstufen wurden die HEK293-Zellen mit dem EGFR und dem MR transfiziert. Es erfolgte die Inkubation mit EGF (10 $\mu\text{g/l}$) bzw. mit der Kombination von EGF (10 $\mu\text{g/l}$) und Aldosteron (10 nM). Dabei stellte sich gegenüber dem Vehikel ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 durch

EGF, Aldo, die Kombination EGF/Aldo und durch PMA dar. Eine signifikante Änderung des Effekts auf die ERK1/2-Phosphorylierung gegenüber der alleinigen Gabe von EGF konnte bei der kombinierten Gabe von Aldosteron und EGF nicht beobachtet werden, es zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einer geringeren ERK1/2-Phosphorylierung (824% vs. 668%, $p=0,186$; siehe Abb.20).

Ein hemmender Einfluss von Aldosteron über den MR auf eine ERK1/2-phosphorylierende Wirkung lässt sich somit nur für die Gabe von Angiotensin II, jedoch nicht für die Gabe von PMA oder EGF darstellen.



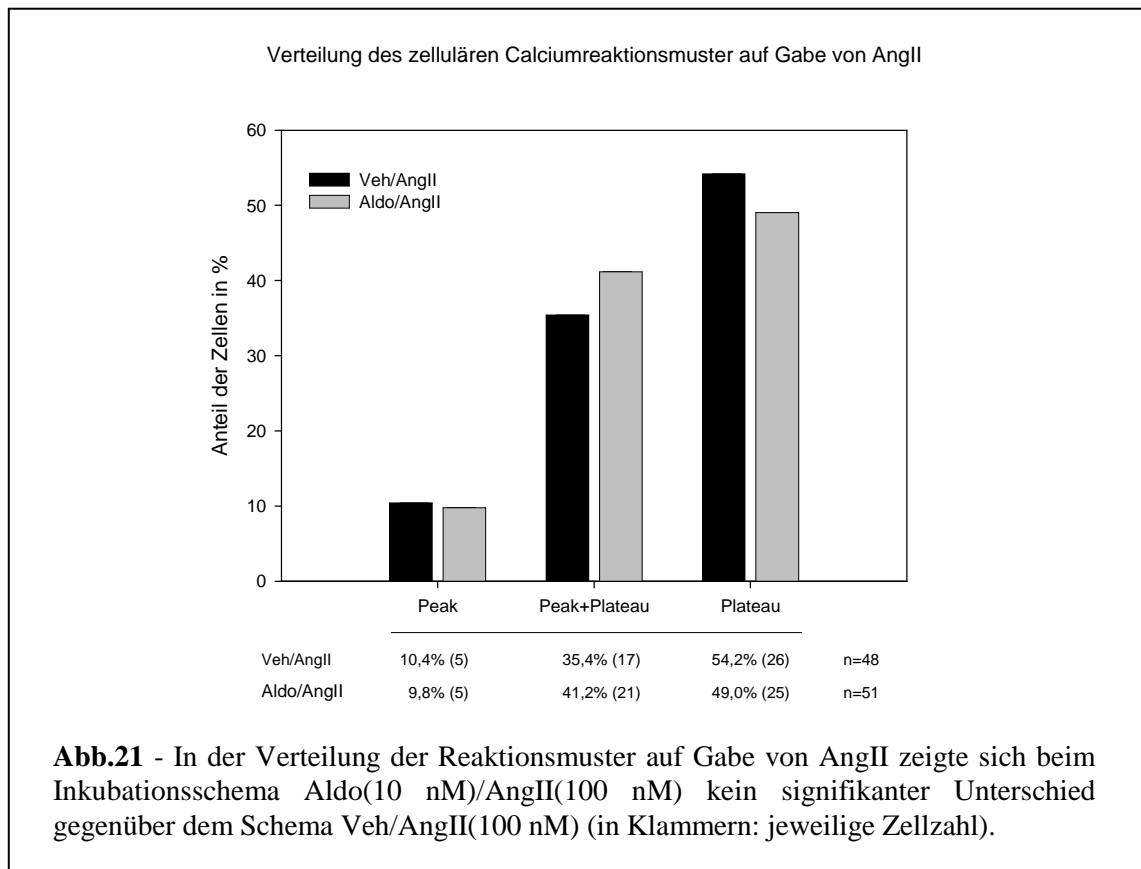
4.3. Betrachtung der zellulären Calcium-Homöostase

Um zu untersuchen, inwieweit Aldo über den MR vermittelt einen Einfluss auf das Calcium-Signal von AngII ausübt, wurden Versuche zur Messung der Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration durch AngII mit und ohne Vorinkubation mit Aldo durchgeführt. In den oben beschriebenen Versuchen zur Phosphorylierung von ERK1/2 zeigte sich, dass die diesbezüglichen Wechselwirkungen bei der Gabe von AngII und Aldo an die Anwesenheit von MR und AT1R gebunden sind. Bei den Versuchen zur Calcium-Messung wurden daher durchgehend mit MR und AT1R transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in den Versuchen mit den im Methodenteil in Abb.5 dargestellten zwei Inkubationsschemata behandelt. Dabei lag die Konzentration für AngII bei 100 nM und für Aldosteron bei 10 nM.

4.3.1. Verteilung der Reaktionstypen

Im Methodenteil dieser Arbeit im Abschnitt 3.8.2 wurde bereits beschrieben, dass die Calcium-Antwort der mit dem AT1R ausgestatteten HEK293-Zellen auf die Gabe von AngII in Abhängigkeit von den jeweils dominierenden zellulären Reaktionsmechanismen als „Peak“, „Peak mit nachfolgendem Plateau“ oder als „Plateau“ charakterisiert werden kann.

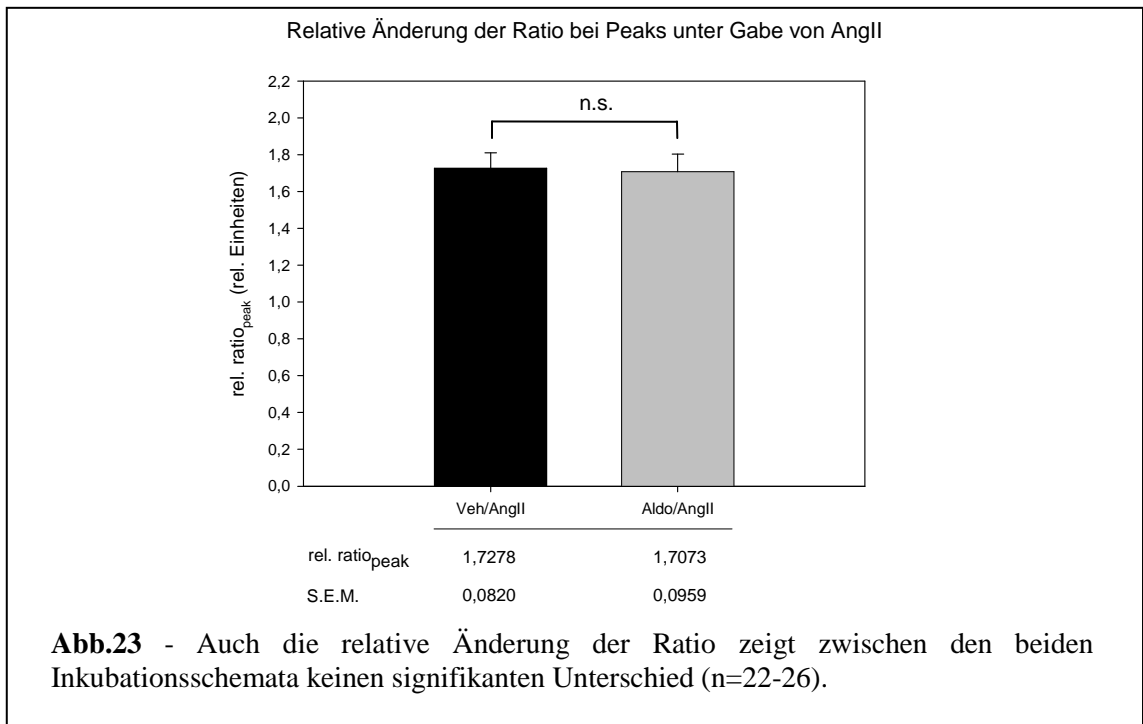
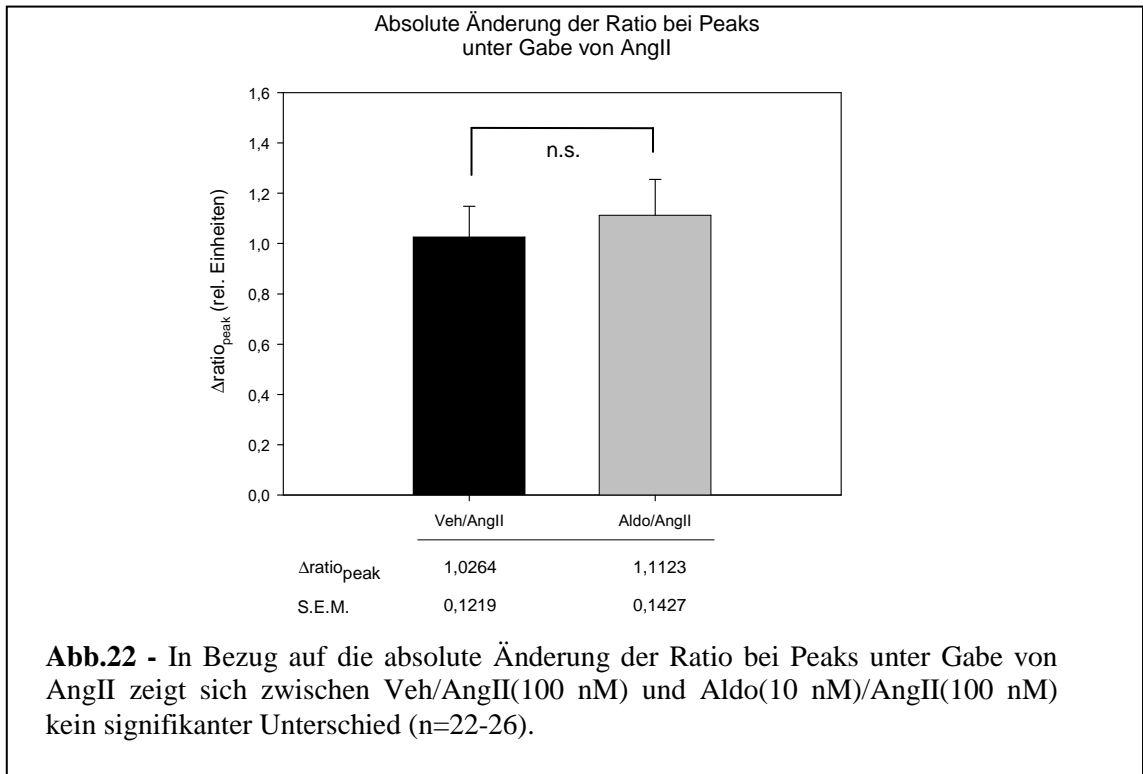
Hinsichtlich der Verteilung der untersuchten Zellen auf diese Reaktionsmuster ließen sich im Vergleich zwischen dem Inkubationsschema Veh/AngII und dem Inkubationsschema Aldo/AngII in den durchgeführten Versuchen keine wesentlichen Unterschiede feststellen (siehe hierzu Abb.21).



4.3.2. Betrachtung des Reaktionstypus „Peak“

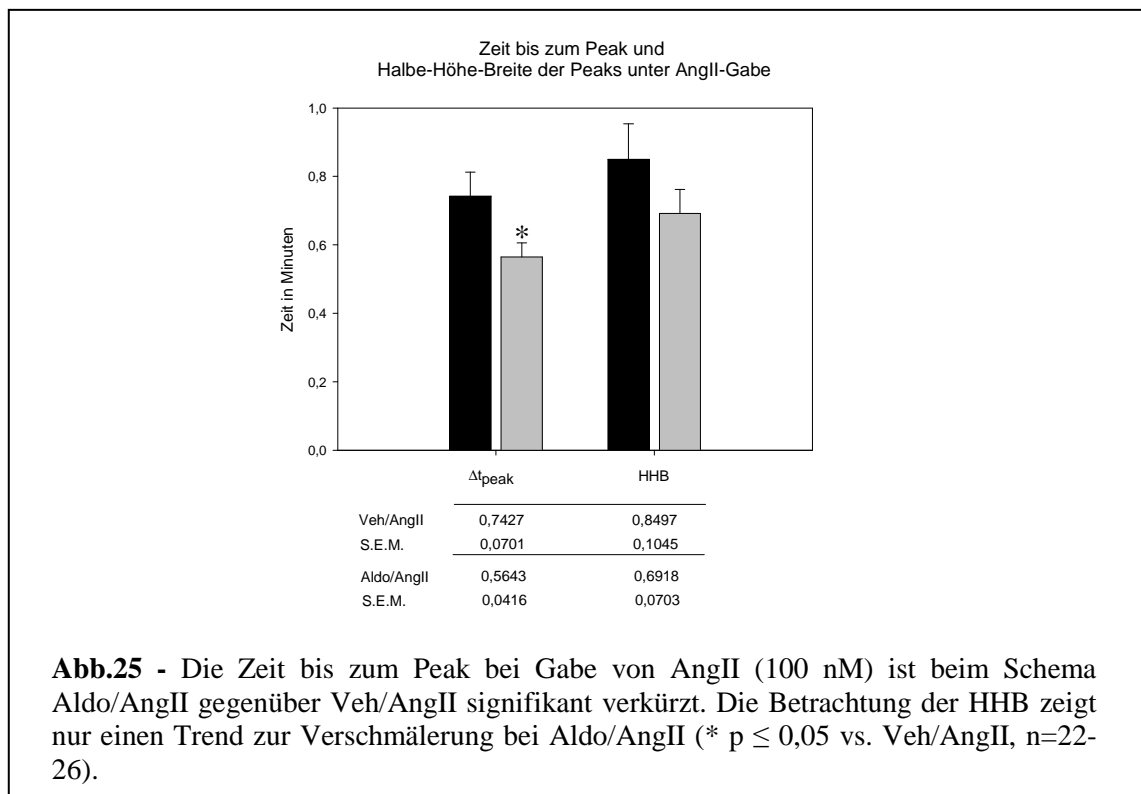
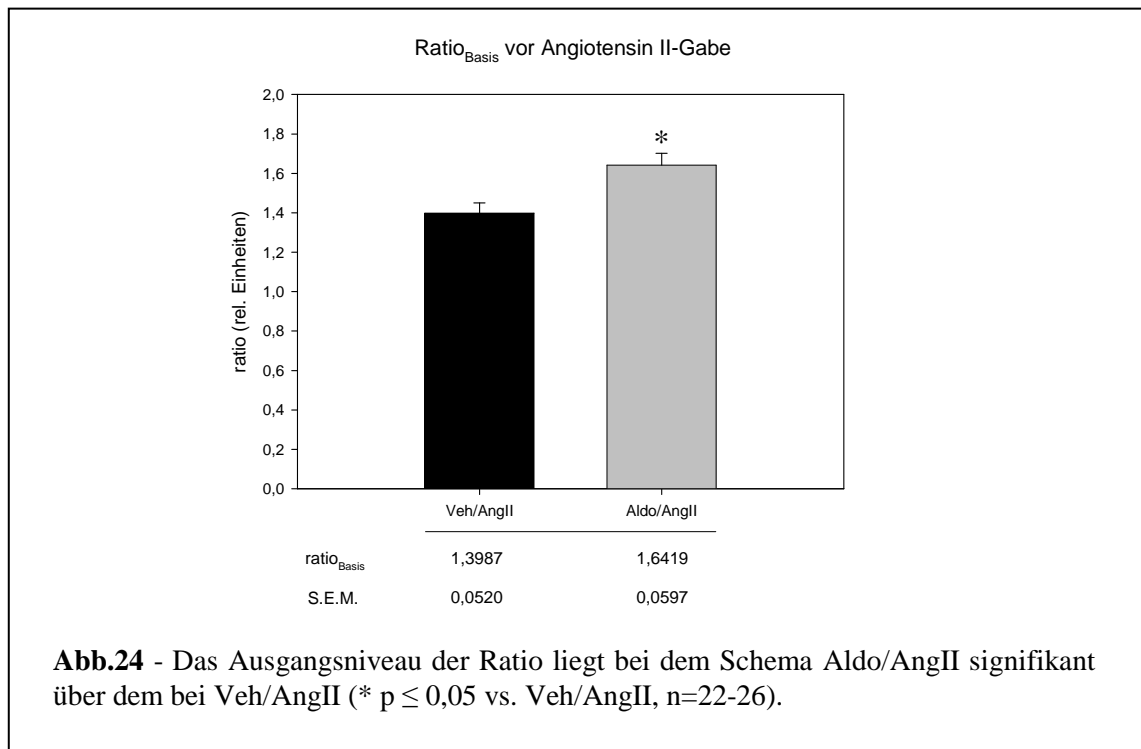
Bei der zusammenfassenden Betrachtung aller derjenigen Zellen, welche als Reaktion auf die Gabe von AngII einen „Peak“ oder einen „Peak mit nachfolgendem Plateau“ gezeigt haben, zeigte sich weder in Bezug auf die absolute noch auf die relative Änderung der gemessenen Ratio ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Inkubationsschemata Veh/AngII und Aldo/AngII ($p=0,33$ bzw. $p=0,44$, siehe Abb.22 u. 23).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch im Ausgangsniveau des intrazellulären Calciums, welches für das Schema Aldo/AngII höher war als für das Schema Veh/AngII (siehe Abb.24).



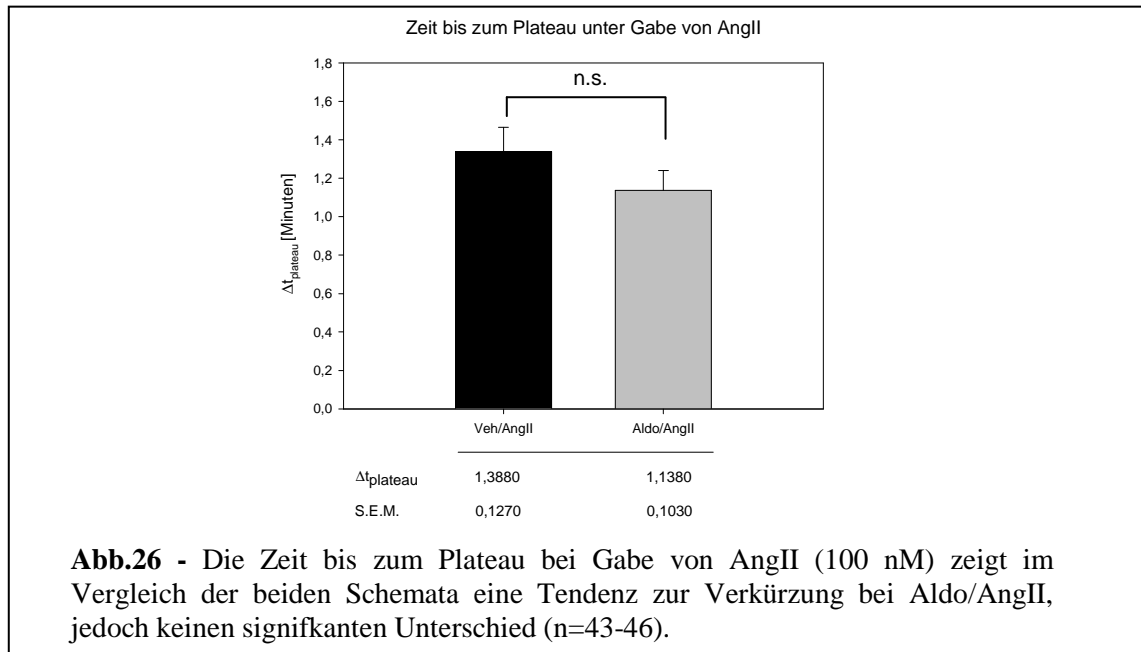
Die Zeit bis zum Erreichen des Peaks (Δt_{peak}) zeigte sich bei den Zellen, welche vor der AngII-Gabe mit Aldosteron inkubiert wurden gegenüber den Zellen mit vorheriger Inkubation mit dem Vehikel signifikant verkürzt. Zur weiteren Untersuchung dieser Differenz wurde als Maß zur näherungsweisen Beschreibung des Anstiegs der Peaks jeweils die Breite des Peaks auf der halben Höhe (HHB, siehe Abb.7) bestimmt und für die beiden Inkubationsschemata verglichen. Hierbei ließ sich weder in der ansteigenden Phase ($p=0,10$) bzw. abfallenden Phase ($p=0,18$) des

Peaks, noch in der Gesamtbreite in der halben Höhe ($p=0,12$) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Inkubationsschemata feststellen (siehe Abb.25).

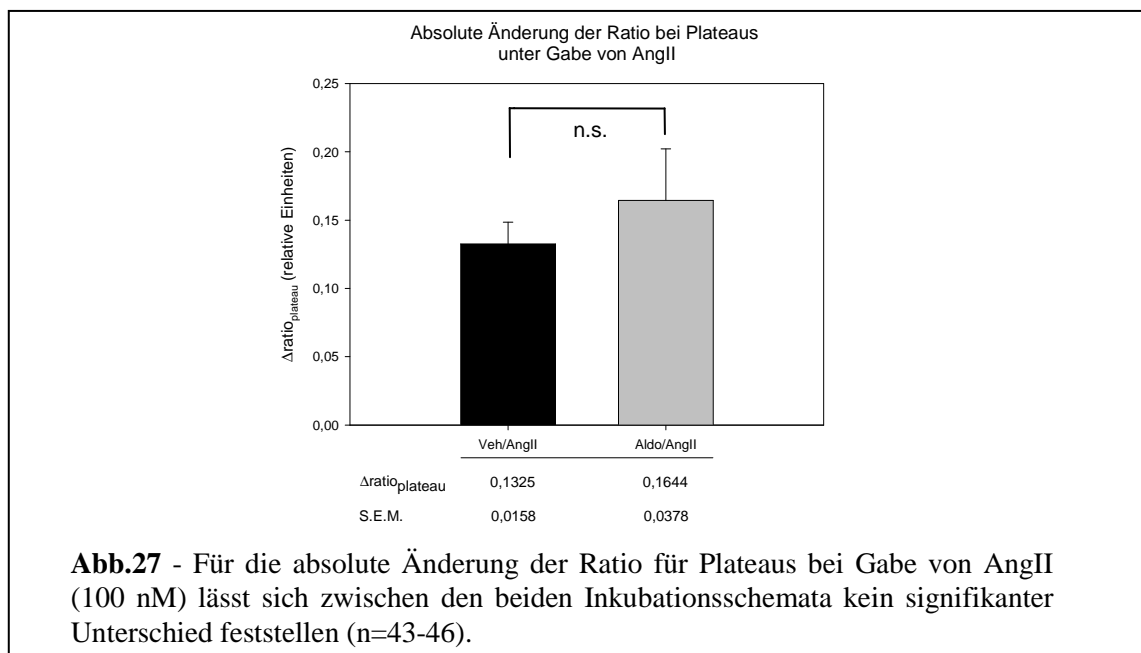


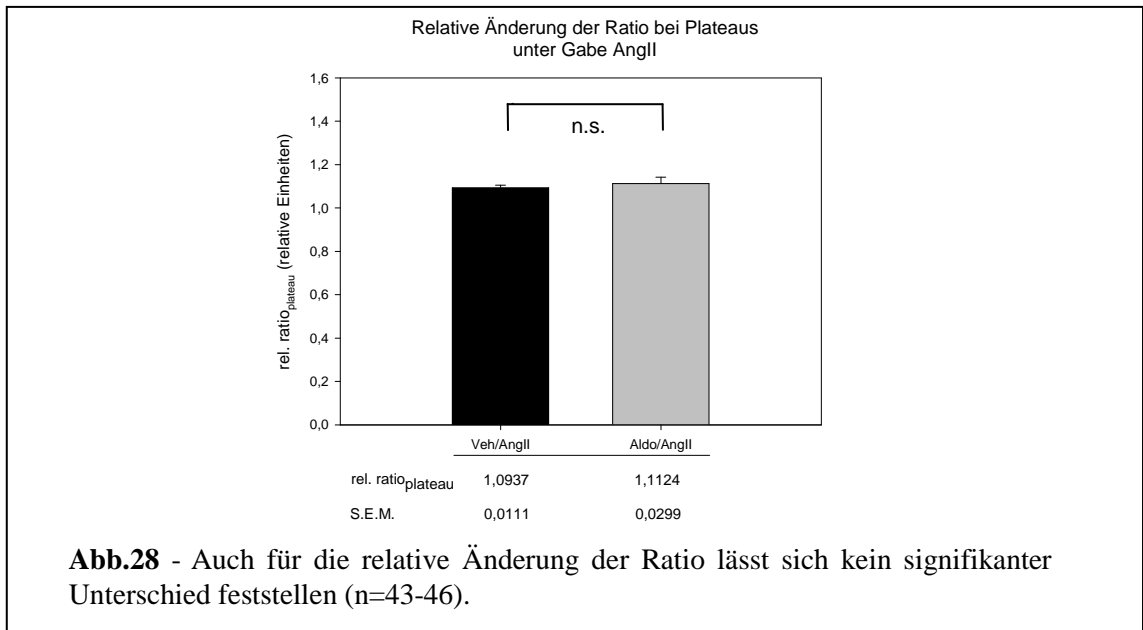
4.3.3. Betrachtung des Reaktionstypus „Plateau“

Für die Zeit bis zum Beginn der Plateaus ($\Delta t_{\text{plateau}}$) zeigte sich ein Trend zu einer Verkürzung unter dem Schema mit Aldo/AngII (1,388 vs. 1,138 Minuten), allerdings war diesbezüglich keine signifikante Änderung zu verzeichnen ($p=0,12$, siehe Abb.26).



Bei den untersuchten Zellen, die mit oder ohne vorangehenden Peak eine Reaktion auf das AngII in Form eines Plateaus zeigten, ergaben sich keine signifikanten Änderungen im Vergleich zwischen dem Schema Veh/AngII und dem Schema Aldo/AngII sowohl im Hinblick auf die absolute ($p=0,22$), als auch die relative ($p=0,28$) Änderung der Ratio (siehe Abb.27 u. 28).





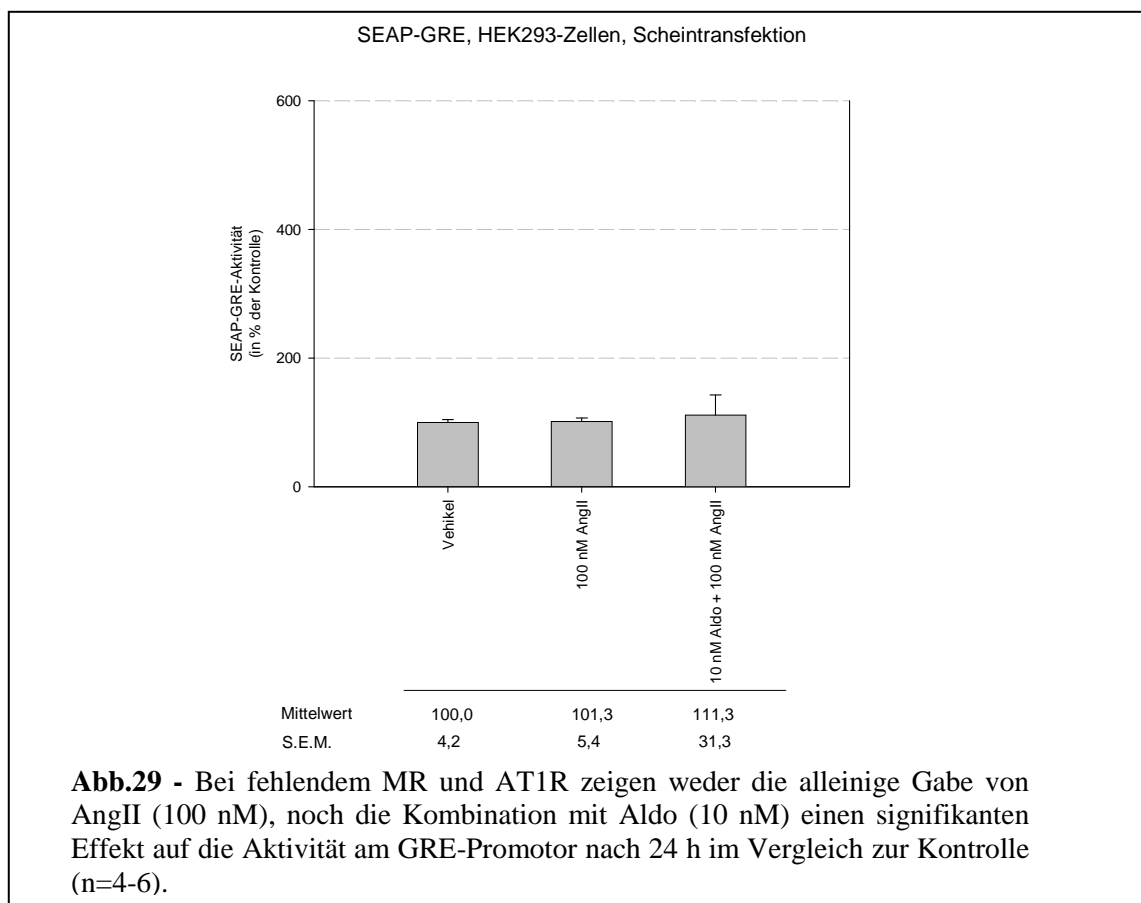
Somit konnte ein signifikanter Einfluss von Aldo/MR nur im Hinblick auf das Ausgangsniveau des intrazellulären Calciums vor Gabe von AngII sowie auf die Zeit bis zum Erreichen des AngII/AT1R-induzierten Calcium-Peaks beobachtet werden.

4.4. Betrachtung der genomischen Aktivität am GRE

In den Versuchen zur Phosphorylierung von ERK1/2 und der Veränderung des intrazellulären Calcium-Niveaus wurde eine mögliche Beeinflussung der Wirkung des aktivierten AT1R durch den aktivierten MR untersucht. Im Folgenden wurde eine mögliche Einflussnahme durch AngII/AT1R auf die genomische Wirkung von Aldo/MR am GRE betrachtet. Hierfür wurde der SEAP-GRE-Reporter-Assay verwendet.

4.4.1. SEAP-GRE-Aktivität bei Abwesenheit von MR und AT1R

Zunächst wurde der Effekt der Gabe von höheren Konzentrationen von AngII (100 nM) allein bzw. der Kombination der höheren Konzentrationen von AngII (100 nM) und Aldo (10 nM) bei Abwesenheit der beiden zugehörigen Rezeptoren an scheintransfizierten HEK293-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich keine nennenswerte Änderung der Aktivität am GRE nach 24 h durch die Gabe der Kombination von Aldo mit AngII oder durch die Gabe von AngII alleine gegenüber der Kontrolle (p=0,78 bzw. 0,89; siehe Abb.29).

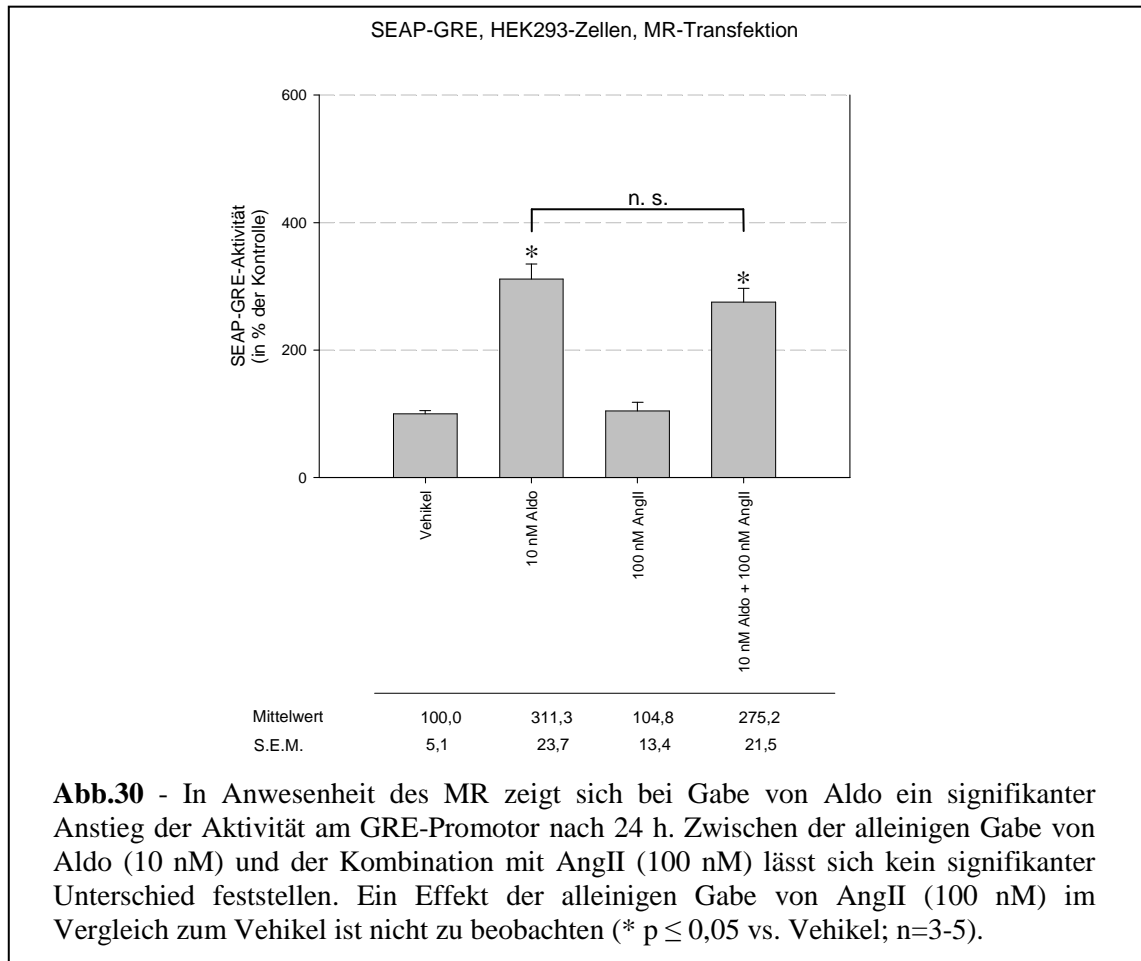


4.4.2. SEAP-GRE-Aktivität bei alleiniger Anwesenheit des MR

Nach Transfektion der HEK293-Zellen mit dem EGFP-C1-hMR konnte bei der Gabe von 10 nM Aldosteron eine signifikante Erhöhung der Aktivität am GRE-Promotor gegenüber der

Kontrolle beobachtet werden. Bei einer alleinigen Gabe von AngII (100 nM) ist bei alleiniger Anwesenheit des MR kein Einfluss auf die GRE-Aktivität zu verzeichnen ($p=0,78$).

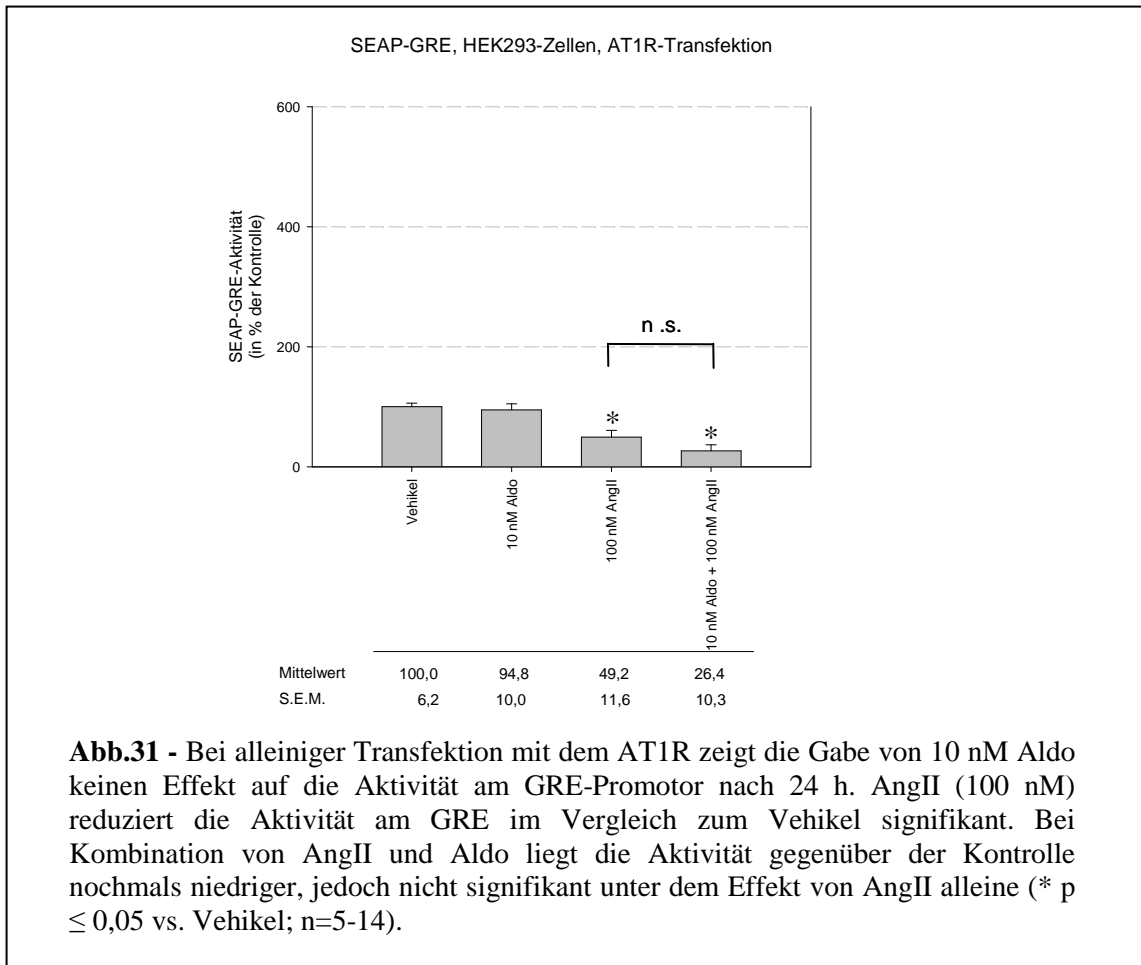
Bei einer kombinierten Gabe von Aldo (10 nM) und AngII (100 nM) zeigt sich unter diesen Bedingungen keine signifikante Änderung der Aktivität am GRE im Vergleich zur alleinigen Gabe von Aldosteron (275% vs. 311 %, $p=0,39$, siehe Abb.30).



4.4.3. SEAP-GRE-Aktivität bei alleiniger Anwesenheit des AT1R

Bei alleiniger Transfektion der HEK293-Zellen mit dem AT1R zeigt sich im Gegensatz zu den Experimenten in Anwesenheit des MR im Vergleich mit der Kontrolle keine stimulierende Wirkung von Aldo (10 nM) auf die Aktivität am GRE mehr. Dagegen zeigt sich bei Gabe von AngII (100 nM) und bei der kombinierten Gabe von AngII und Aldo eine signifikant geringere Aktivität am GRE im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb.31). Dabei konnte zwischen dem Effekt der alleinigen Gabe von AngII und der kombinierten Gabe von Aldo (10 nM) mit AngII kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,20$).

Als Zwischenfazit lässt sich feststellen, dass eine Wirkung von Aldo auf das GRE an die Anwesenheit des MR, und damit wohl an dessen Aktivierung gebunden ist. Für eine Wirkung der Gabe von AngII auf die Aktivität am GRE ist entsprechend die Anwesenheit des AT1R erforderlich.



4.4.4. SEAP-GRE-Aktivität bei Anwesenheit des MR und AT1R

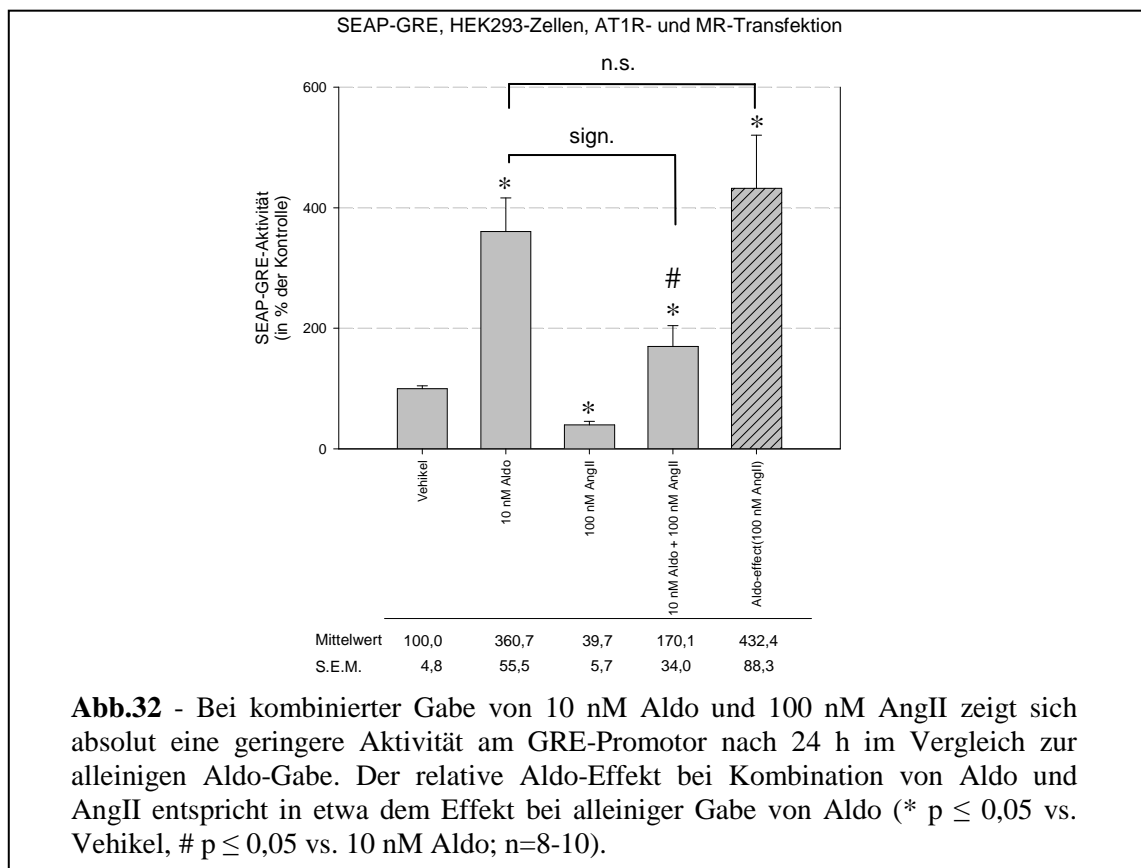
Da der Effekt von Aldo und AngII auf die GRE-Aktivität jeweils an die Anwesenheit des entsprechenden Rezeptors gebunden ist, kann auch bei den Versuchen zur SEAP-GRE-Aktivität davon ausgegangen werden, dass unter kombinierter Gabe von Aldo und AngII zu beobachtende Abweichungen im Vergleich zur jeweils alleinigen Gabe der Substanzen auf eine Interaktion der beiden aktivierten Rezeptoren bzw. deren Signalwege zurückzuführen sind.

Bei der Auswertung der mit verschiedenen Konzentrationen von Aldo bzw. AngII in Anwesenheit der beiden Rezeptoren durchgeführten Versuche wurden jeweils die Wirkung der alleinigen Gabe von Aldo bzw. AngII und die der kombinierten Gabe von Aldo und AngII betrachtet. Die Wirkung der kombinierten Gabe von Aldo und AngII auf die Aktivität am GRE kann dabei auf zweierlei Weise beurteilt werden: Zum einen absolut im Vergleich zum Vehikel, zum anderen lässt sich aber auch ein relativer Effekt von Aldo auf die Aktivität am GRE unter Berücksichtigung eines Eigeneffektes von AngII berechnen:

$$\text{Aldo-effect(AngII)} = \text{Effekt(Aldo+AngII)} / \text{Effekt(AngII)}.$$

Bei höheren Konzentrationen von Aldo (10 nM) und AngII (100 nM) zeigt sich sowohl bei alleiniger Gabe von Aldo, als auch bei der kombinierten Gabe von Aldo und AngII eine

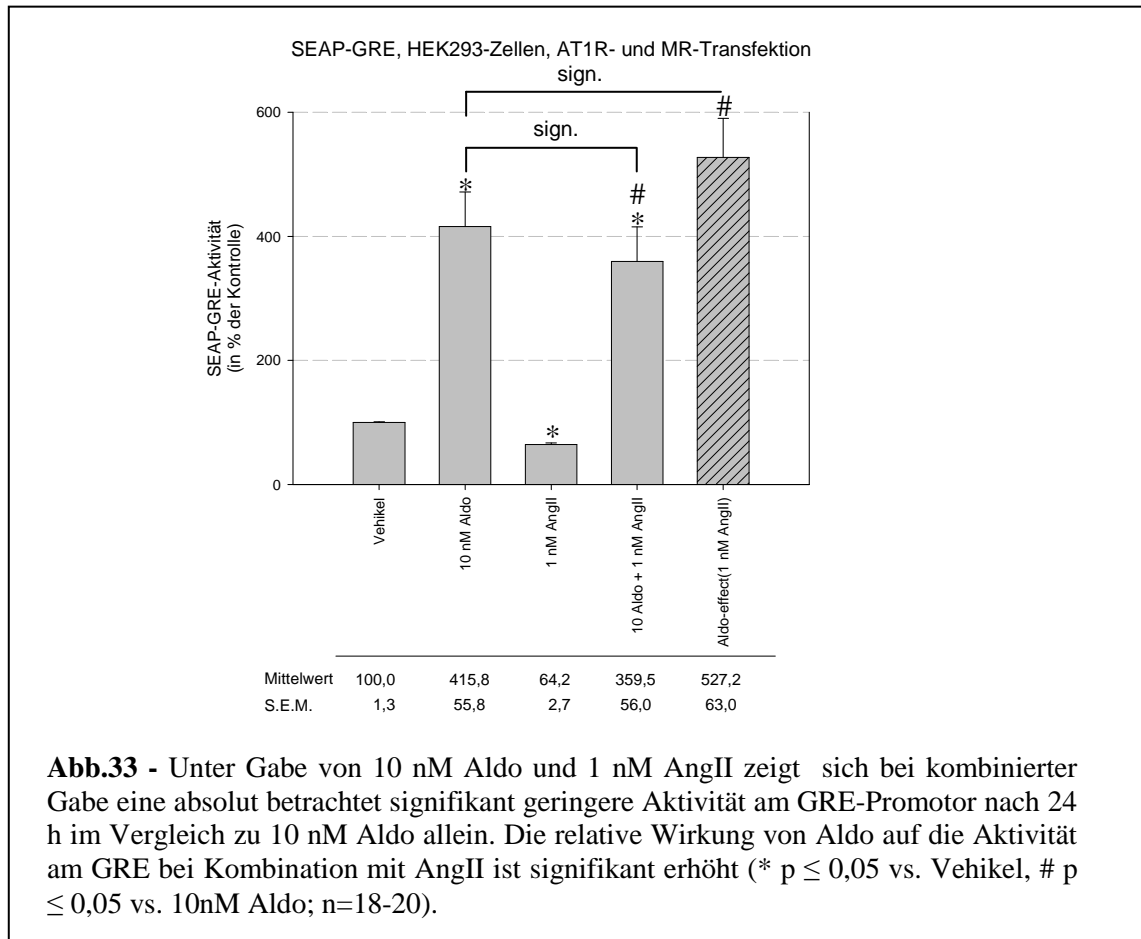
signifikant gesteigerte Aktivität am GRE-Promotor gegenüber der Kontrolle. Die alleinige Gabe von AngII führt zu einer signifikant geringeren Aktivität am GRE im Vergleich zur basalen Aktivität unter Gabe des Vehikels. Der absolute Effekt der kombinierten Gabe von Aldo und AngII ist signifikant geringer als der einer alleinigen Gabe von Aldo. Der relative Aldo-Effekt unter Berücksichtigung des AngII-Effektes bei kombinierter Gabe von Aldo und AngII liegt jedoch auf dem Niveau der alleinigen Gabe von Aldo ($p=0,53$; siehe Abb.32).



Wird die verwendete AngII-Konzentration auf 1 nM reduziert und die von 10 nM Aldo beibehalten, zeigt sich bei der kombinierten Gabe von Aldo und AngII eine signifikant gesteigerte Aktivität am GRE-Promotor gegenüber dem Vehikel. Wie schon bei der Kombination von 10 nM Aldo mit 100 nM AngII beobachtet, zeigt auch hier die kombinierte Gabe einen signifikant geringeren Effekt als die alleinige Gabe von Aldo. Bei der reduzierten Konzentration von AngII (1 nM) ist allerdings der relative Aldo-Effekt auf die Aktivität am GRE gegenüber dem Effekt der alleinigen Gabe von Aldo signifikant erhöht (siehe Abb.33). Die basale Aktivität am GRE wird bei 1nM AngII, wie schon für eine höhere AngII-Konzentration (100 nM) beobachtet, signifikant gesenkt.

Belässt man die Konzentration von AngII bei 1 nM und reduziert die Konzentration von Aldo auf 1 nM, so zeigt sich bei alleiniger Gabe von Aldo und bei der kombinierten Gabe von Aldo und AngII die bereits unter den anderen Konzentrationsverhältnissen beobachtete signifikant gesteigerte Aktivität am GRE-Promotor gegenüber der Kontrolle. Der absolute Effekt von Aldo

(1 nM) in Kombination mit AngII (1 nM) unterscheidet sich dagegen nicht von dem bei der alleinigen Gabe von Aldo ($p=0,81$). Der relative Effekt von Aldo bei der kombinierten Gabe ist im Vergleich zum Effekt der alleinigen Gabe von Aldo weiterhin signifikant erhöht (Abb.34).



Wird die Konzentration von Aldo weiter reduziert auf 0,1 nM unter Beibehaltung der Konzentration des AngII von 1nM, liegt bei der kombinierten Gabe von Aldo und AngII die Aktivität am GRE nicht signifikant über dem Niveau der Kontrolle, jedoch signifikant unter der bei alleiniger Gabe von Aldo (0,1 nM). Für die alleinige Gabe von Aldo (0,1 nM) ist eine signifikant gesteigerte Aktivität am GRE-Promotor gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Zwischen dem relativen Aldo-Effekt bei kombinierter Gabe und dem Effekt der alleinigen Gabe von Aldo am GRE war kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,32$; s. Abb.35).

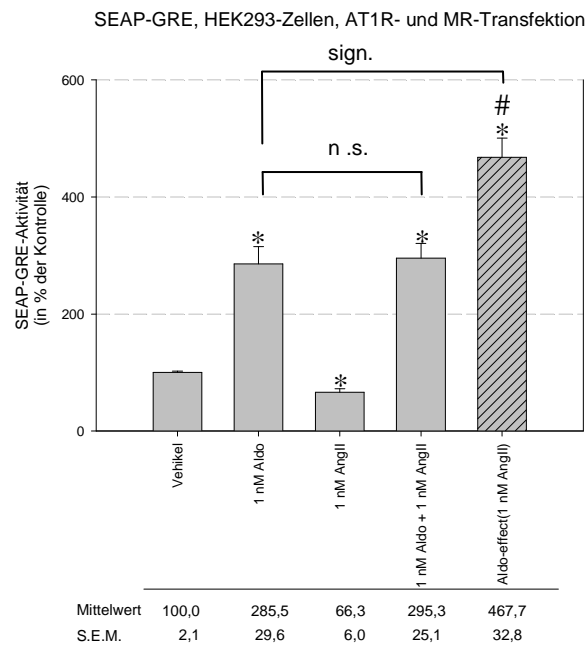


Abb.34 - Bei einer Aldo-Konzentration von 1 nM ergibt sich in der Kombination mit 1 nM AngII eine unveränderte absolute SEAP-GRE-Aktivität nach 24 h im Vergleich zur alleinigen Aldo-Gabe. Der relative Aldo-Effekt ist signifikant erhöht. (* $p \leq 0,05$ vs. Vehikel, # $p \leq 0,05$ vs. 1 nM Aldo; $n=9-11$).

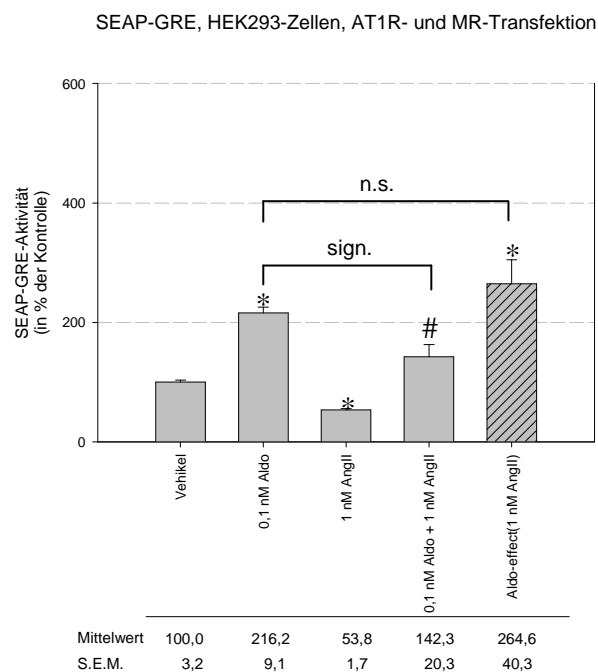


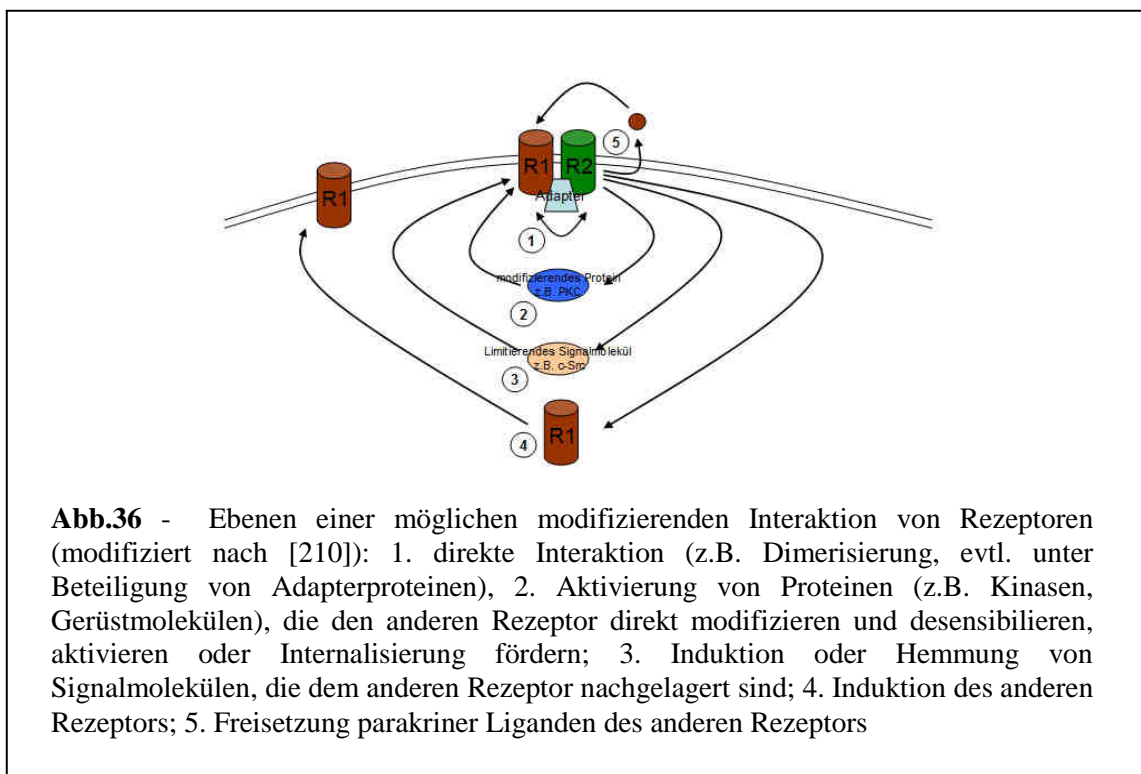
Abb.35 - Bei Gabe von 0,1 nM Aldo zeigt sich bei der Kombination mit 1 nM AngII eine signifikant geringere Aktivität am GRE nach 24 h als durch Aldo alleine. Der relative Aldo-Effekt unterscheidet sich nicht vom absoluten Effekt der alleinigen Aldo-Gabe (* $p \leq 0,05$ vs. Vehikel, # $p \leq 0,05$ vs. 0,1 nM Aldo; $n=6-7$).

5. Diskussion

5.1. Ebenen einer möglichen Wechselwirkung in der Signaltransduktion von AT1R und MR

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Phosphorylierung von ERK1/2, zur zellulären Calcium-Homöostase und zur Aktivierung am GRE dienten der Untersuchung einer funktionellen Interaktion der Signaltransduktion von humanem AT1R und humanem MR sowie der Erlangung von Hinweisen auf zugrunde liegende Mechanismen.

Funktionell betrachtet können die Rezeptoren aufeinander positiv (verstärkend), negativ (hemmend) oder keinen Einfluss bzgl. verschiedener zellulärer Signalmechanismen nehmen. Diese Effekte können zeit- und/oder konzentrationsabhängig sein. Liegt eine funktionelle Interaktion vor, so können die zugrunde liegenden Mechanismen auf unterschiedlichen Ebenen angesiedelt sein (s. Abb.36) [210].



5.2. Wechselwirkung von AT1R und MR im Hinblick auf die ERK1/2-Phosphorylierung

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in dem Zellmodell an die Anwesenheit des AT1R gebunden ist.

In der Literatur ist eine potenzierende Wirkung von Aldo auf eine AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung beschrieben worden [129-131]. Ein solcher Effekt von Aldo konnte in dieser Arbeit in den HEK293-Zellen bei den betrachteten Konzentrationen und Inkubationszeiten nicht verzeichnet werden. Ein signifikanter Einfluss von Aldo auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung wurde hier dagegen in Form einer Hemmung gesehen. Dieser hemmende Effekt war für niedrige Konzentrationen (AngII 1 nM, Aldo 100 pM) bei einer Inkubationsdauer

von 5 min, bei höheren Konzentrationen (AngII 100 nM, Aldo 10 nM) bei einer Inkubationsdauer von 30 min zu verzeichnen.

Eine mögliche Ursache für diesen Widerspruch zur Literatur könnte im verwendeten Zellmodell liegen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von MR und AT1R in einem klar definierten System untersucht. Daneben sind auch Unterschiede aufgrund der verwendeten Konzentrationen und der betrachteten Zeitpunkte denkbar.

Wie in der Einleitung aufgezeigt unterscheiden sich die AngII-induzierten Signalwege selbst innerhalb von Zelltypen in Art und Ausprägung, woraus sich Konsequenzen im Zusammenspiel von AngII/AT1R und Aldo/MR ergeben können. In den Studien, welche eine potenzierende Wirkung von Aldo und AngII bezüglich ERK1/2 beschreiben, wurden VSMC aus der Aorta bzw. aus mesenterialen Arterien verwendet [129-131]. Montezano et al. führten Untersuchungen bei 5 min und 30 min mit niedrigen Konzentrationen von AngII (0,1 nM) und Aldo (0,1 nM) durch, wobei für die Kombination von AngII und Aldo eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2, und auch von c-Src, zu beiden Zeitpunkten beschrieben wurde [130]. Bei Min et al. wurde der Verlauf der ERK1/2-Phosphorylierung unter gemeinsamer Gabe von Aldo und AngII über einen längeren Zeitraum verfolgt und ein erster Peak bei 10-15 min, ein zweiter bei 2-4 h gesehen, was in etwa dem dort beobachteten zeitlichen Verlauf bei alleiniger Gabe einer höheren AngII-Konzentration (100 nM) entspricht. Bei der dort beobachteten Potenzierung des AngII-Effektes wurden im Vergleich zu Montezano et al. nochmals niedrigere Konzentrationen von AngII (0,1 nM) und Aldo (1 pM) angewendet, welche bei der alleinigen Gabe keine Wirkung auf die Phosphorylierung von ERK1/2 zeigten [129].

Die hier mit HEK293-Zellen bei geringen Konzentrationen (AngII 1 nM, Aldo 0,1 nM) durchgeführten Versuche zeigten dagegen bei insgesamt schwachem Signal bei 30 min keinen signifikanten Effekt von Aldo auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung und bei 5 min keine Potenzierung, sondern eine Hemmung.

In einer anderen Studie wurde ein potenzierender Effekt hinsichtlich der ERK1/2-Phosphorylierung bei den höheren Konzentrationen von Aldo (10 und 100nM) und AngII (10 und 100nM) bei 2 min beschrieben, eine Aussage zu späteren Zeitpunkten erfolgte nicht [131]. In den HEK293-Zellen ließ sich bei solchen Konzentrationen von AngII und Aldo bei einer etwas längeren Inkubation (5 min) kein signifikanter Einfluss von Aldo beobachten, so dass hier der Unterschied im Zelltyp entscheidend sein könnte. In keiner der vorliegenden Studien wurde der Effekt der Kombination von höheren Konzentrationen von Aldo und AngII in einer verzögerten Phase der ERK1/2-Aktivierung (nach 30 min) untersucht.

Die Frage der Dosierungen spielt auch im Zusammenhang mit an Organen beobachteten Effekten von Aldo auf AngII-Wirkungen eine Rolle. In atrialen Trabeculae wurde eine mit steigender Konzentration von Aldo zunehmende negative Wirkung auf die basale und AngII-vorstimulierte Kontraktilität beschrieben. Der negative Effekt war durch Hemmung der PKC in

einen positiven umwandelbar [189]. An koronaren Mikroarterien sorgte eine 30-minütige Vorinkubation mit 10 nM Aldo für eine signifikante Verstärkung der AngII-induzierten Kontraktion, bei 0,1 μ M Aldo zeigte sich dagegen ein Trend zu einer Hemmung [95]. Im Übrigen ist auch eine Dosisabhängigkeit des Einflusses von Aldo auf eine EGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung mit teils glockenförmigem Verlauf beschrieben worden [133, 134]. Es ist denkbar, dass ein potenzierender Effekt von Aldo auf die ERK1/2-Phosphorylierung bei anderen Konzentrationsverhältnissen und/oder Zeitpunkten auch in HEK293-Zellen zu beobachten ist. Bei niedrigen Konzentrationen von AngII und Aldo zeigten die HEK293-Zellen jedoch nur eine schwach über dem Hintergrund liegende ERK1/2-Phosphorylierung, was eine Aussage bei weiter reduzierten Konzentrationen sehr erschwert.

Die Ergebnisse zur ERK1/2-Phosphorylierung führen zu der Frage, warum es im HEK293-Zellmodell bei den höheren Konzentrationen bei 30 min Inkubationszeit bzw. bei niedrigen Konzentrationen bei 5 min Inkubationszeit zu einer hemmenden Wirkung von Aldo auf den Effekt von AngII kommt. Eine Aktivierung von Signalproteinen darf nicht allzu lange anhalten und sollte einer kontrollierenden Rückkopplung unterliegen. Ansonsten wäre die Zelle über diese Wege längere Zeit nicht differenziert ansprechbar. Die Beobachtung einer im Gesamteffekt geringeren Wirkung der Kombination von AngII und Aldo zu einem Zeitpunkt, wo AngII alleine noch eine stärkere Wirkung hat, könnte als Ergebnis einer übermäßigen Gegenregulation betrachtet werden. HEK293-Zellen sind für den AT1R und den MR natürlicherweise naiv. Es ist denkbar, dass die stöchiometrischen Verhältnisse der Signalproteinausstattung in den HEK293-Zellen für ein Überwiegen bzw. Überschiessen ERK1/2-gegenregulierender Signalproteine und -wege sorgen. Die Beobachtungen in dem hier verwendeten Modell mit HEK293-Zellen sind damit nicht weniger für die Pathophysiologie relevant. Für das Verständnis des Zusammenwirkens von AngII/AT1R und Aldo/MR in der Pathophysiologie könnte gerade die Identifikation solcher verstärkenden oder gegenregulierenden Signalproteine von besonderem Interesse sein.

Die Vielzahl und Zelltypabhängigkeit der an der ERK1/2-Phosphorylierung beteiligten Signalproteine erschwert die Aufdeckung des molekularen Mechanismus des Hemmeffektes von Aldo. Die überwiegende Anzahl der Studien zur AngII-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung macht Aussagen zu den Signalprozessen zu einem frühen Zeitpunkt, meist 5-10 min. Bei 30 min können durchaus wieder andere Mechanismen eine Rolle spielen. Beobachtungen, wie die eines zweigipfeligen ROS-Verlaufs in VSMC nach Gabe von AngII mit einem zweiten Peak bei 30 min [103] oder die Verschiebung der Anteile von Gq- und β -Arrestin-vermittelter ERK1/2-Phosphorylierung [153] unterstützen die Annahme, dass es im Zeitablauf zu einer Verschiebung in der Gewichtung unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege zur ERK1/2-Phosphorylierung kommt.

Basierend auf den wesentlichen Signalstrecken der AngII-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung ergeben sich eine Reihe von Ansatzpunkten für eine Hemmwirkung von Aldo/MR (s. Abb.37).

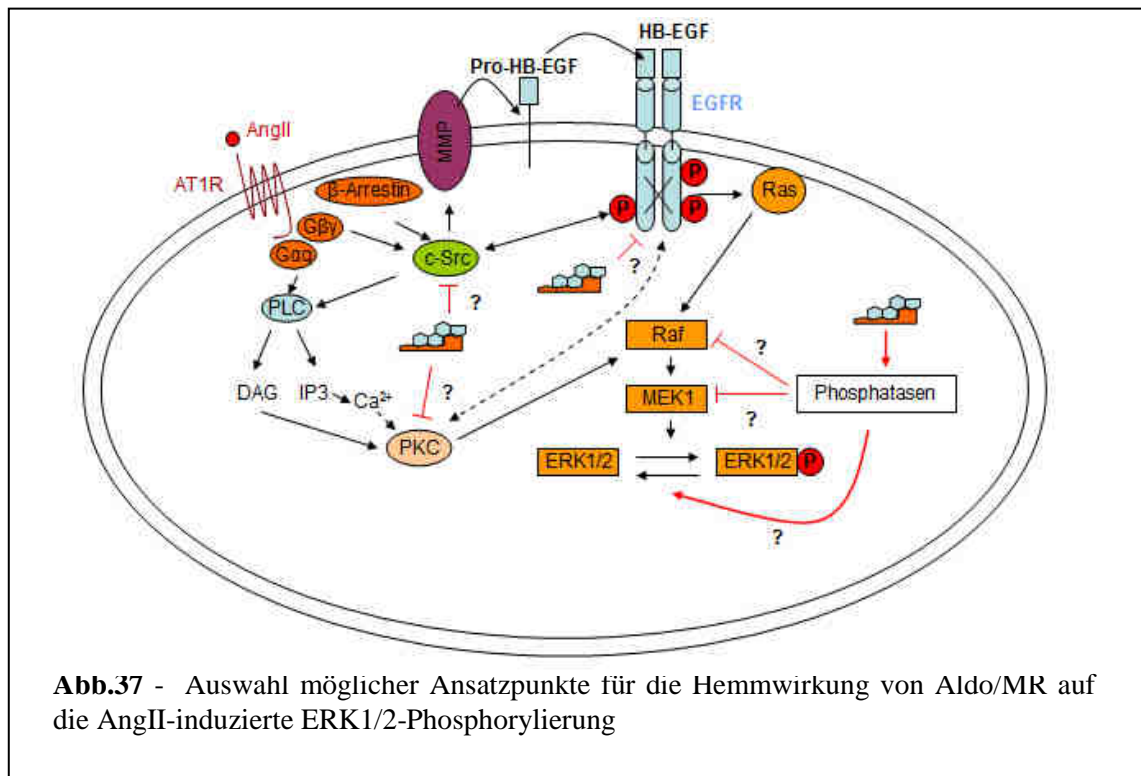


Abb.37 - Auswahl möglicher Ansatzpunkte für die Hemmwirkung von Aldo/MR auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung

In verschiedenen Studien ergaben sich Hinweise auf ein Nebeneinander verschiedener AngII-induzierter Signalwege zur ERK1/2-Phosphorylierung innerhalb eines Zelltyps [15, 17, 149, 153]. In diesem Fall müsste Aldo die beobachtete hemmende Wirkung entweder auf einer späten Stufe der Signalgebung, auf welche die parallelen Wege konvergieren entfalten oder mehrere Signalwege parallel auf höher gelagerten Signalproteinstufen hemmen. Die MEK und ERK1/2 selbst kommen zumindest beim beobachteten Effekt nach 30 min und höheren Konzentrationen eher nicht als Ziel hemmender Mechanismen in Betracht, da sie unterhalb der Ebene der Raf-Aktivierung durch PMA liegen und man somit einen Einfluss von Aldo auf die ERK1/2-phosphorylierende Wirkung von PMA erwarten müsste. Unter den hier verwendeten Konzentrationen fand sich bei 30 min Inkubation diesbezüglich jedoch kein Hinweis.

Ein möglicher Konvergenzpunkt ist die Beteiligung des EGFR. Es gibt zahlreiche Berichte über die Beteiligung des EGFR an der AngII-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in verschiedenen Zelltypen [15, 17, 149, 151, 152, 157, 159, 160, 162]. Eine Beteiligung von Src an der AngII-induzierten EGFR-Transaktivierung wurde beschrieben [15, 151, 157, 159, 160]. Auch eine Modifikation der Aktivität von Src könnte somit an der Hemmwirkung von Aldo/MR beteiligt sein. Die Aussagen zu einer Beteiligung der EGFR-Tyrosinkinase und Src an der AngII-induzierten Phosphorylierung von ERK1/2 in HEK293-Zellen sind widersprüchlich [151, 160], wobei die Untersuchungen hierzu zu einem frühen Zeitpunkt (5 min) mit 100 nM AngII

erfolgten und keine Aussage über eine Beteiligung des EGFR bei 30 min machen. Eine Beteiligung des EGFR im Sinne einer Transaktivierung kann neben der Autophosphorylierung, also abhängig von der EGFR-Tyrosinkinase, auch durch eine Trans-Phosphorylierung durch Src am Tyrosinrest Tyr845 erfolgen, welche durch Gabe eines EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors unbeeinflusst bleibt und eine Rolle bei der Phosphorylierung von ERK1/2 spielt [122, 211]. Sowohl Aldo, AngII als auch EGF induzieren über Src eine EGFR-Phosphorylierung an Tyr845 [15, 17, 110, 211], die anhaltend gerade für eine spätere Phase der ERK1/2-Phosphorylierung wesentlich sein kann [15]. Eine Beeinträchtigung der Funktion von Src durch Aldo/MR könnte zu einer Minderung der Tyr845-EGFR-Phosphorylierung führen und damit insbesondere zur bei 30 min und höheren Konzentrationen beobachteten Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung beitragen. Zum anderen kann Aldo/MR durch die Aktivierung von PKC-Isoformen Einfluss auf den EGFR nehmen. Eine Ko-Aktivierung der PKC- α durch direkte Bindung von Aldo im Zusammenspiel mit Calcium wurde beschrieben [108]. In verschiedenen Zelltypen wurde unter Einsatz unterschiedlicher PKC-Inhibitoren die Verstärkung einer GPCR-induzierten EGFR-Phosphorylierung gesehen, unter anderem auch für AngII/AT1R. Dies kann als physiologische negative Rückkopplung des GPCR-aktivierten PKC-Weges, insbesondere über die PKC- α , auf einen gleichzeitig GPCR-aktivierten EGFR interpretiert werden [137]. In CHO-Zellen wurde zudem eine Hemmung der EGF-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung bei 5 min durch PMA-induzierte PKC-Aktivierung verzeichnet [134]. In HEK293-Zellen konnte bei Untersuchungen zur EGF-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung unter Gabe eines PKC-Inhibitors eine anhaltende EGFR-Phosphorylierung im Vergleich zu einer ansonsten beobachteten Abnahme nach 15 min gesehen werden, hier wurde eine Rolle von Tyrosin-Phosphatasen diskutiert [212]. Das Überschreiten einer natürlichen PKC-vermittelten Feedback-Hemmung der EGFR-Aktivität durch zusätzliche Aktivierung der PKC durch Aldo könnte die aktivierende Wirkung von AngII am EGFR bremsen und so die ERK1/2-Phosphorylierung wie beobachtet beeinträchtigen. Aldo kann die PKC- α mechanistisch anders aktivieren als AngII und EGF. Man könnte spekulieren, dass dies zur Verstärkung einer hemmenden Wirkung auf den EGFR, aber keiner weiteren Steigerung der aktivierenden Wirkung auf Raf führt und somit in Summe die ERK1/2-phosphorylierende Wirkung von AngII beeinträchtigt. Allerdings ergab sich bei den hier durchgeführten Experimenten zur Untersuchung der EGF-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung bei 30 min bei der verwendeten Konzentration von Aldo und EGF kein signifikanter Einfluss von Aldo/MR. Lediglich ein leichter Trend zu einer geringeren ERK1/2-Phosphorylierung war zu verzeichnen. Somit scheint eine Beeinträchtigung der EGFR-Tyrosinkinase nicht der wesentliche Mechanismus für den Hemmeffekt von Aldo auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung bei 30 min und höheren Konzentrationen zu sein. Eine Störung von Membranprozessen als Ursache der Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung durch Aldo/MR ist ebenfalls denkbar. Für den AT1R, den EGFR, c-Src sowie den MR ist eine

Assoziation mit Cav-1 und die Lokalisation in Caveolae beschrieben worden [124, 125, 213-215]. Sowohl für den AT1R als auch den MR wurde eine Kollokalisierung bzw. Komplexbildung mit dem EGFR beobachtet [124, 141]. Eine Beteiligung von Cav-1 an einer prolongierten AngII-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung über den EGFR wurde beschrieben [15]. Durch seine Anwesenheit in den Interaktionsbezirken von AT1R und EGFR in der Zellmembran könnte der ligandenaktivierte MR zu Störungen in der Bildung von Multiproteinkomplexen führen oder Signalproteine für seine Zwecke „umleiten“ und damit die Effektivität der durch AngII über Caveolae induzierten Signalkaskaden beeinträchtigen.

Calcium spielt zum Teil eine Rolle für die ERK1/2-Phosphorylierung durch AngII [151, 156, 159, 163] und ist beteiligt an der Aktivierung von Src oder PKC-Isoformen. Eine Beeinflussung des AngII-Effektes durch Aldo wäre auch über das Calcium denkbar. Die Calcium-Messungen in dieser Arbeit geben aber erstmal keinen Anhalt hierfür, betrachten aber auch nur den kurzfristigen Effekt bei höheren Konzentrationen.

Auch die Beeinträchtigung der PKC könnte eine Rolle bei der beobachteten hemmenden Wirkung von Aldo auf die ERK1/2-Phosphorylierung spielen. Eine Reihe von Studien zur ERK1/2-Phosphorylierung durch AngII beschreibt eine Beteiligung der PKC [17, 148-151, 153-158]. Zum Teil wurden dabei spezielle Isoformen der PKC als verantwortlich identifiziert, so die neue PKC- δ [156, 157] und die atypische PKC- ζ [17, 158]. PMA-aktivierte PKC-Isoformen scheinen aufgrund der hier beobachteten unbeeinträchtigten PMA-Wirkung bei 30 min weniger wahrscheinlich als Ursache einer hemmenden Aldo-Wirkung. Auch bei 5 min scheint Aldo (10 nM) keinen Einfluss auf eine PMA(100 nM)-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung zu haben [134]. Aldo/MR könnte auf die atypische, PMA-unabhängige, PKC- ζ eine hemmende Wirkung entfalten. In neonatalen kardialen Myozyten wurde eine schnell einsetzende, über wenigstens 20 min anhaltende Hemmung der PKC-Aktivität durch Aldo gesehen [216]. Eine direkte Bindung von Aldo an die PKC konnte dort nicht nachgewiesen werden. Die Hemmung war für Konzentrationen ≥ 10 nM maximal und betraf allerdings auch die PMA-induzierte PKC-Aktivität sowie Calcium-sensitive und -insensitive PKC-Isoformen, was nicht zu der hier beobachteten unbeeinträchtigten ERK1/2-Phosphorylierung durch PMA bei 30 min passt.

Eine Aktivierung von Phosphatasen, wie der MKP-1 durch Aldo über den MR mit Dephosphorylierung und Inaktivierung von beteiligten Signalmolekülen wäre ebenfalls als Ursache für die hemmende Wirkung auf die AngII-induzierte Aktivierung von ERK1/2 zu diskutieren.

Schließlich ist auch eine direkte physische Modifikation des AT1R durch den MR denkbar. Ricchiuti et al. beobachteten eine Zunahme der Assoziation von AT1R und MR und eine einhergehende reduzierte ERK1/2-Phosphorylierung unter Niedrig-NaCl-Zufuhr. Möglicherweise stört die Assoziation der beiden Rezeptoren die Signalgebung des AT1R, der

Effekt auf ERK1/2 könnte jedoch auch auf der gleichzeitig beobachteten reduzierten Expression der beiden Rezeptoren unter dieser Diät beruhen [217].

Bei dem beobachteten hemmenden Effekt bei 30 min könnten auch erste genomische Effekte von Aldo eine Rolle spielen. Aldo induziert die Expression von GILZ nach bereits 30 min. Für T-Zellen ist eine Raf-1-hemmende Wirkung von GILZ beschrieben [60, 61]. Eine Hemmung von Raf-1 könnte einen Teil der beobachteten Hemmwirkung von Aldo/MR auf die ERK1/2-Phosphorylierung erklären. Allerdings existieren weitere Raf-Isoformen und zudem wurde ein unterschiedliches Verhalten von Raf-1 und ERK1/2 [150] sowie PKC-abhängige Raf-unabhängige [149, 158] Wege zur Phosphorylierung von ERK1/2 beschrieben.

Auch das Chaperon HSP90 könnte an der Hemmwirkung von Aldo bei 30 min beteiligt sein. Eine Aktivierung des MR führt zur Freisetzung von HSP90 im Kern. Nach einer, zu einer später einsetzenden Hemmwirkung passenden, Verzögerung durch den Transportprozess aus dem Kern kommt es zu einer gesteigerten intrazellulären Verfügbarkeit von ungebundenem HSP90. Der Einfluss von HSP90 auf die ERK1/2-Phosphorylierung ist allerdings nicht eindeutig. Eine Assoziation von HSP90 mit Src scheint zu einer anhaltenden Aktivierung von Src und Transaktivierung des EGFR zu führen [110, 218], was sich positiv auf die ERK1/2-Phosphorylierung auswirken kann. HSP90 unterstützt zudem den Zusammenbau von Raf-Proteinen [219]. HSP90 spielt auch eine Rolle bei der Stabilisierung und Verhinderung des Abbaus des EGFR [220-222]. Andererseits wurde unter HSP90-Hemmung eine anhaltende Aktivierung von ERK1/2 und Src gesehen [223]. HSP90 bindet in HEK293-Zellen an die Protein-Phosphatase 5 (PP5) und fördert die Bildung von Komplexen mit ERK1/2, was zur Hemmung der Aktivität von Raf-1 führt [224].

Die Untersuchungen in dem vorliegenden, definierten System zeigen, dass der AT1R und MR hinreichend sind für eine hemmende Interaktion in Bezug auf die Phosphorylierung von ERK1/2, jedoch nicht für eine diesbezügliche positive Interaktion.

5.3. Wechselwirkung von AT1R und MR im Hinblick auf die zelluläre Calcium-Homöostase

5.3.1. Einfluss von Aldo/MR auf den Reaktionstyp der Zellen

Bei den durchgeführten Messungen des intrazellulären Calciums kann bei den Zellen als Reaktion auf die Gabe von AngII zwischen „Peaks“, „Peaks mit nachfolgendem Plateau“ und „Plateaus“ unterschieden werden (siehe Abschnitt 3.8.2.). Prinzipiell kann das zytosolische Calcium durch einen Einstrom von extrazellulär, getrieben durch den hohen Gradienten für Calcium (ca. 1:10.000) erfolgen. Andererseits kann es auch, wie schon beschrieben, zu einer Freisetzung aus intrazellulären Speichern kommen. Eine Veränderung in der Verteilung der Reaktionsmuster könnte auf einen Einfluss von Aldo auf die AngII/AT1R-induzierten zellulären

Mechanismen der Calciumfreisetzung oder des Calciumeinstroms hinweisen. Eine entsprechende Wirkung von Aldo (10 nM) wurde in MDCK-Zellen auf die EGF(10 µg/l)-induzierte Calciumantwort gesehen, wo im Gegensatz zur alleinigen EGF-Gabe in der Mehrzahl der Zellen ein Peak mit nachfolgender Plateauphase beobachtet werden konnte [133]. In den für diese Arbeit durchgeführten Messungen zeigten sich unter der Inkubation mit 10 nM Aldo keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Reaktionstypen auf die Gabe von 100 nM AngII gegenüber der Kontrolle. Somit ergibt sich unter den verwendeten Konzentrationsverhältnissen kein Hinweis auf einen Einfluss von Aldo/MR auf die dominierenden Mechanismen der AngII/AT1R-induzierten Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels.

5.3.2. Einfluss von Aldo/MR auf Zellen mit Reaktionstyp „Peak“

In aortalen VSMC wurde ein Effekt von Aldo auf das intrazelluläre Calcium in Form eines erreichten Plateaus nach 3-5 min beschrieben, dessen Niveau im Vergleich zu dem von AngII sehr gering ist [176]. Ein entsprechender geringer Effekt von Aldo wurde auch in den hier durchgeführten Experimenten mit HEK293-Zellen in Form eines signifikant erhöhten Ausgangsniveaus des intrazellulären Calciums beim Schema Aldo/AngII gesehen. In der Studie von Wehling et al. wurde eine potenzierende Wirkung von Aldo auf die AngII-induzierte Calcium-Antwort beobachtet. Dort führte die vorherige Gabe von Aldo (100 nM) bereits bei einer AngII-Konzentration von 0,1 pM zu einer typischen Peak-förmigen Reaktion, während diese AngII-Konzentration alleine keine Wirkung hatte. Zu den Ursachen der AngII-sensibilisierenden Wirkungen machte diese Studie keine Aussage, ebenso wenig zum Effekt bei höheren AngII-Konzentrationen.

Bei der Betrachtung aller HEK293-Zellen, die in der Reaktion auf die Gabe von 100 nM AngII einen „Peak“ gezeigt haben, war hinsichtlich der Veränderung des intrazellulären Calciums weder absolut noch relativ ein signifikanter Unterschied zwischen den mit 10 nM Aldo inkubierten Zellen und den Zellen unter Kontrollbedingung zu verzeichnen. Für die Zeitspanne von der AngII-Gabe bis zum Erreichen des Peaks zeigte sich unter der Gabe von Aldo eine signifikante Verkürzung gegenüber der Kontrollbedingung. Hinsichtlich des Verlaufs des Anstiegs selbst konnte unter zu Hilfenahme der HHB kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Somit scheint die Verkürzung eher durch ein früheres Einsetzen des Ca^{2+} -Anstiegs bedingt zu sein. Möglicherweise ist dies durch das bei der vorherigen Inkubation mit Aldosteron beobachtete erhöhte Calcium-Ausgangsniveau bedingt.

5.3.3. Einfluss von Aldo/MR auf Zellen mit Reaktionstyp „Plateau“

Für die Zellen mit Ausbildung eines Plateaus unter Gabe von 100 nM AngII zeigten sich weder in Bezug auf die absoluten oder relativen Veränderungen des intrazellulären Calciumniveaus,

noch auf die Zeitspanne von der AngII-Gabe bis zum Beginn des Plateaus bei Inkubation mit 10 nM Aldo signifikante Unterschiede im Vergleich mit der Kontrollbedingung.

Zusammenfassend lässt sich in Anwesenheit des MR bei den verwendeten Konzentrationen von AngII und Aldo unter der Gabe von Aldo für den beobachteten Zeitrahmen kein wesentlicher Einfluss auf die Wirkung von AngII hinsichtlich der intrazellulären Calcium-Homöostase im Vergleich zu der Kontrollbedingung feststellen. Über die schnelle Calciumantwort lässt sich eine Wechselwirkung von AngII/AT1R und Aldo/MR somit nicht erklären. Allerdings bilden die Versuche nur einen kurzfristigen Verlauf ab, so dass eine spätere Veränderung in den intrazellulären Calciumverhältnissen nicht ausgeschlossen werden kann.

5.4. Wechselwirkung von AT1R und MR in Hinblick auf die genomische Aktivität am GRE

5.4.1. Aktivität am GRE in Abwesenheit von MR und/oder AT1R

In Abwesenheit von AT1R und MR konnte weder durch 100 nM AngII noch durch die Kombination mit 10 nM Aldo bei 24 h Inkubation ein Unterschied im Vergleich zu der basalen Aktivität am GRE-Promotor verzeichnet werden.

Bei alleiniger Verfügbarkeit des MR zeigte sich bei Inkubation mit 10 nM Aldo eine signifikante Steigerung der Aktivität am GRE, während bei Inkubation mit 100 nM AngII kein Effekt auf die basale GRE-Aktivität zu verzeichnen war. Bei kombinierter Gabe von 10 nM Aldo und 100 nM AngII konnte kein Unterschied gegenüber der alleinigen Gabe von 10 nM Aldo festgestellt werden.

Bei alleiniger Verfügbarkeit des AT1R führte die alleinige Gabe von 10 nM Aldo zu keiner Veränderung der GRE-Aktivität. Dagegen zeigte sich ein signifikant hemmender Einfluss von AngII (100 nM) und der Kombination von AngII und Aldo auf die basale Aktivität am GRE-Promotor, wobei zwischen der alleinigen Gabe von AngII und der Kombination mit Aldo kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen war.

Aus diesen Beobachtungen kann insgesamt abgeleitet werden, dass die Effekte von Aldo bzw. AngII auf das GRE jeweils von der Anwesenheit ihres Rezeptors (MR bzw. AT1R) abhängen.

5.4.2. Aktivität am GRE bei Verfügbarkeit von MR und AT1R

In Anwesenheit von MR und AT1R zeigte sich bei der kombinierten Gabe von Aldo und AngII eine gegenüber der alleinigen Gabe von Aldo geringere MR-induzierte Aktivität am GRE. Dies ist am ehesten auf eine allgemein hemmende Wirkung von AngII über den AT1R am GRE, welche bereits in Bezug auf die basale Aktivität zu beobachten ist, zurückzuführen. Eine negative Wirkung der Gabe von AngII (100 nM bzw. 1 nM) konnte in unserem Labor bei Anwesenheit des AT1R und MR auch im Hinblick auf die basale Aktivität und Aldo-induzierte

Aktivität an weiteren Promotern (AP-1, NFκB, NFαT, Myc) bei 24 h Inkubationsdauer beobachtet werden. Es handelt sich somit offenbar nicht um einen GRE-spezifischen Effekt von AngII auf die Aldo/MR-vermittelte Wirkung.

Die relative Aktivierung des MR durch Aldo (relativer Aldo-Effekt) unter Berücksichtigung der hemmenden Wirkung von AngII auf die basale Aktivität am GRE bleibt im Vergleich zu der Aktivierung durch eine alleinige Gabe von Aldo erhalten. Bei niedriger Konzentration von AngII (1 nM) zeigte sich in Kombination mit zunehmenden Konzentrationen von Aldo (0,1 nM, 1 nM, 10 nM) eine Zunahme des relativen Aldo-Effektes. Für 1 nM und 10 nM Aldo lag dieser signifikant über dem absoluten Effekt von Aldo, woraus bei diesen Konzentrationsverhältnissen auf einen effektiveren Mechanismus der GRE-Aktivierung durch Aldo/MR geschlossen werden kann. In der Summe führt eine Kombination von Aldo mit AngII trotzdem zu einer geringeren Aktivität des MR am GRE.

Sowohl beim relativen Effekt von Aldo als auch beim Effekt der kombinierten Gabe von AngII und Aldo war eine Abnahme des Aktivitätszuwachses am GRE mit steigender Aldo-Konzentration in der Kombination mit niedriger AngII-Konzentration zu beobachten. Ein glockenförmiger Verlauf der absoluten Aktivität am GRE mit steigenden Aldo-Konzentrationen ist in der Literatur beschrieben worden [74]. Möglicherweise erfolgt durch AngII/AT1R eine Linksverschiebung in der Dosis-Wirkungs-Kurve von Aldo/MR am GRE.

5.4.3. Hemmende Wirkung von AngII/AT1R auf die Aktivität am GRE-Promotor

Die Frage nach der Ursache für die Hemmwirkung von AngII/AT1R am GRE, aber auch weiteren Promotoren bietet Raum für weitere Untersuchungen. Eine Erklärungsmöglichkeit könnten zellulär gegenregulierende Maßnahmen in Reaktion auf eine anhaltende Förderung der Freisetzung von ROS durch AngII/AT1R darstellen. Es wurde beobachtet, dass ROS einen Einfluss auf die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 und NFκB nehmen können [104]. Eine ROS-Gegenregulierung könnte in der Folge die Aktivität an redoxsensiblen Transkriptionsfaktoren negativ modulieren. Dem widerspricht allerdings die Beobachtung in HEK293-Zellen, dass die Aldo-induzierte GRE-Aktivität gerade negativ durch ROS (exogenes H₂O₂) reguliert wird und kein Effekt von ROS an AP-1 und NFκB zu verzeichnen war [75]. Möglicherweise ist die bei Pfau et al. verwendete Dosierung von exogenem H₂O₂ am Grenzbereich der ROS-Pufferkapazität der Zellen aber auch nicht ausreichend für die Ingangsetzung von ROS-regulierenden Mechanismen mit Einfluss auf andere Transkriptionsfaktoren.

Eine Erklärung der Abnahme der Aktivität am GRE bei Gabe von AngII könnte in der Limitierung von Faktoren des allgemeinen Transkriptionsapparates liegen. Es ist denkbar, dass es durch eine AngII-induzierte Steigerung der Aktivität an anderen Promotoren zu einem

Engpass im Transkriptionsapparat mit Folgen für die Aldo-induzierte Promotor-Aktivität kommt.

In einer VSMC-Studie wurde nach längerer Inkubationsdauer (5 Tage) bei alleinigen Gaben von AngII (100 nM) bzw. Aldo (0,8 nM) dagegen eine Aktivierung von NFκB und AP-1 beobachtet [190]. Der Unterschied zu den Beobachtungen kann somit wiederum durch den Zelltyp, die Beobachtungszeit und die verwendeten Konzentrationen begründet sein.

Eine mögliche Einflussnahme von AngII auf die Aldo/MR-induzierte Aktivität am GRE kann auch über die Beeinflussung der ERK1/2-Aktivität oder des intrazellulären Calciums erfolgen [74, 75]. Dass in der Signalgebung von AngII/AT1R und Aldo/MR bezüglich der ERK1/2-Phosphorylierung Wechselwirkungen auftreten, konnte auch in den Versuchen in dieser Arbeit mit HEK293-Zellen bei der Inkubation bis 30 min beobachtet werden. Im längeren Zeitverlauf (24 h) sind ebenfalls Wechselwirkungen mit Einfluss auf ERK1/2 und damit wiederum auf die Aktivität am GRE vorstellbar.

6. Zusammenfassung

Insgesamt liefern die Ergebnisse der durchgeführten Experimente weitere Evidenz für eine komplexe Interaktion von AngII/AT1R und Aldo/MR in Bezug auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und die genomische Aktivität am GRE.

Es zeigte sich hinsichtlich der AngII-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung ein hemmender Einfluss von Aldo/MR bei kurzer Inkubation (5 min) mit niedrigen Konzentrationen sowie bei längerer (30 min) Inkubation mit höheren Konzentrationen. Der Hemmeffekt scheint zumindest bei 30 min nicht durch eine Beeinträchtigung der EGFR-Tyrosinkinase oder von PMA-sensiblen PKC-Isoformen bedingt zu sein.

Die Kombination von Aldo/MR und AngII/AT1R führt zu einer in Summe geringeren Aktivität des MR am GRE. Dies ist am ehesten durch einen allgemein hemmenden Einfluss von AngII über den AT1R auf die Aktivität des MR am GRE bedingt. Die relative Aktivierung des MR durch Aldo bleibt jedoch erhalten und ist bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen sogar gesteigert.

Abgesehen von einem signifikant erhöhten Ausgangsniveau des intrazellulären Calciums und einer verkürzten Zeit bis zum Eintreten eines Peaks, konnte bei der verwendeten Konzentration von AngII und Aldo im kurzfristigen Verlauf kein Einfluss von Aldo/MR auf die AngII/AT1R-induzierte Calcium-Reaktion gesehen werden.

In dem in dieser Arbeit verwendeten definierten System mit AT1R und MR in HEK293-Zellen zeigt sich, dass die Anwesenheit von AT1R und MR nicht hinreichend für eine positive Interaktion ist, jedoch für eine hemmende Interaktion bezüglich der Phosphorylierung von ERK1/2 und der Aktivität am GRE.

Zukünftige weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die zugrunde liegenden Signalprozesse in HEK293-Zellen in ihrer Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit genauer zu charakterisieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(4): p. 639-72.
2. Ichihara, A., H. Kobori, A. Nishiyama, and L.G. Navar, *Renal renin-angiotensin system*. *Contrib Nephrol*, 2004. **143**: p. 117-30.
3. Gekle, M. and C. Grossmann, *Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly?* *Pflugers Arch*, 2009. **458**(2): p. 231-46.
4. Kobori, H., M. Nangaku, L.G. Navar, and A. Nishiyama, *The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease*. *Pharmacol Rev*, 2007. **59**(3): p. 251-87.
5. Nishiyama, A. and S. Kim-Mitsuyama, *New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: overview of regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system*. *J Pharmacol Sci*, 2010. **113**(4): p. 289-91.
6. Crackower, M.A., R. Sarao, G.Y. Oudit, C. Yagil, I. Kozieradzki, S.E. Scanga, A.J. Oliveira-dos-Santos, J. da Costa, L. Zhang, Y. Pei, J. Scholey, C.M. Ferrario, A.S. Manoukian, M.C. Chappell, P.H. Backx, Y. Yagil, and J.M. Penninger, *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. *Nature*, 2002. **417**(6891): p. 822-8.
7. Benigni, A., P. Cassis, and G. Remuzzi, *Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging*. *EMBO Mol Med*, 2010. **2**(7): p. 247-57.
8. de Gasparo, M., K.J. Catt, T. Inagami, J.W. Wright, and T. Unger, *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 415-72.
9. Curnow, K.M., L. Pascoe, E. Davies, P.C. White, P. Corvol, and E. Clausen, *Alternatively spliced human type 1 angiotensin II receptor mRNAs are translated at different efficiencies and encode two receptor isoforms*. *Mol Endocrinol*, 1995. **9**(9): p. 1250-62.
10. Curnow, K.M., L. Pascoe, and P.C. White, *Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor*. *Mol Endocrinol*, 1992. **6**(7): p. 1113-8.
11. Lappano, R. and M. Maggiolini, *G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2011. **10**(1): p. 47-60.
12. Cho, H., K. Harrison, O. Schwartz, and J.H. Kehrl, *The aorta and heart differentially express RGS (regulators of G-protein signalling) proteins that selectively regulate sphingosine 1-phosphate, angiotensin II and endothelin-1 signalling*. *Biochem J*, 2003. **371**(Pt 3): p. 973-80.
13. Grant, S.L., B. Lassegue, K.K. Griendling, M. Ushio-Fukai, P.R. Lyons, and R.W. Alexander, *Specific regulation of RGS2 messenger RNA by angiotensin II in cultured vascular smooth muscle cells*. *Mol Pharmacol*, 2000. **57**(3): p. 460-7.
14. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **292**(1): p. C82-97.
15. Chen, J., J.K. Chen, and R.C. Harris, *Angiotensin II induces epithelial-to-mesenchymal transition in renal epithelial cells through reactive oxygen species/Src/caveolin-mediated activation of an epidermal growth factor receptor-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway*. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(5): p. 981-91.

16. Ushio-Fukai, M. and R.W. Alexander, *Caveolin-dependent angiotensin II type 1 receptor signaling in vascular smooth muscle*. Hypertension, 2006. **48**(5): p. 797-803.
17. Kim, J., S. Ahn, K. Rajagopal, and R.J. Lefkowitz, *Independent beta-arrestin2 and Gq/protein kinase Czeta pathways for ERK stimulated by angiotensin type 1A receptors in vascular smooth muscle cells converge on transactivation of the epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 2009. **284**(18): p. 11953-62.
18. Noor, N., C.B. Patel, and H.A. Rockman, *Beta-arrestin: a signaling molecule and potential therapeutic target for heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(4): p. 534-41.
19. Reiter, E. and R.J. Lefkowitz, *GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(4): p. 159-65.
20. AbdAlla, S., H. Lother, and U. Quitterer, *AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration*. Nature, 2000. **407**(6800): p. 94-8.
21. Hansen, J.L., J. Theilade, S. Haunso, and S.P. Sheikh, *Oligomerization of wild type and nonfunctional mutant angiotensin II type I receptors inhibits galphaq protein signaling but not ERK activation*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 24108-15.
22. Zeng, C., Y. Luo, L.D. Asico, U. Hopfer, G.M. Eisner, R.A. Felder, and P.A. Jose, *Perturbation of D1 dopamine and AT1 receptor interaction in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2003. **42**(4): p. 787-92.
23. Oppermann, M., N.J. Freedman, R.W. Alexander, and R.J. Lefkowitz, *Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C*. J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13266-72.
24. Wong, P.C., R. Bernard, and P.B. Timmermans, *Effect of blocking angiotensin II receptor subtype on rat sympathetic nerve function*. Hypertension, 1992. **19**(6 Pt 2): p. 663-7.
25. Liang, W., G.Y. Oudit, M.M. Patel, A.M. Shah, J.R. Woodgett, R.G. Tsushima, M.E. Ward, and P.H. Backx, *Role of phosphoinositide 3-kinase {alpha}, protein kinase C, and L-type Ca²⁺ channels in mediating the complex actions of angiotensin II on mouse cardiac contractility*. Hypertension, 2010. **56**(3): p. 422-9.
26. 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.
27. Li, D.Y., Y.C. Zhang, M.I. Philips, T. Sawamura, and J.L. Mehta, *Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type I receptor activation*. Circ Res, 1999. **84**(9): p. 1043-9.
28. Feener, E.P., J.M. Northrup, L.P. Aiello, and G.L. King, *Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1353-62.
29. Schieffer, B., E. Schieffer, D. Hilfiker-Kleiner, A. Hilfiker, P.T. Kovanen, M. Kaartinen, J. Nussberger, W. Harringer, and H. Drexler, *Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability*. Circulation, 2000. **101**(12): p. 1372-8.
30. Zou, Y., I. Komuro, T. Yamazaki, S. Kudoh, R. Aikawa, W. Zhu, I. Shiojima, Y. Hiroi, K. Tobe, T. Kadowaki, and Y. Yazaki, *Cell type-specific angiotensin II-evoked signal transduction pathways: critical roles of Gbetagamma subunit, Src family, and Ras in cardiac fibroblasts*. Circ Res, 1998. **82**(3): p. 337-45.
31. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. Science, 1988. **240**(4854): p. 889-95.

32. Lu, N.Z., S.E. Wardell, K.L. Burnstein, D. Defranco, P.J. Fuller, V. Giguere, R.B. Hochberg, L. McKay, J.M. Renoir, N.L. Weigel, E.M. Wilson, D.P. McDonnell, and J.A. Cidlowski, *International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(4): p. 782-97.
33. Zennaro, M.C., M.C. Keightley, Y. Kotelevtsev, G.S. Conway, F. Soubrier, and P.J. Fuller, *Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(36): p. 21016-20.
34. Arriza, J.L., C. Weinberger, G. Cerelli, T.M. Glaser, B.L. Handelin, D.E. Housman, and R.M. Evans, *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor*. *Science*, 1987. **237**(4812): p. 268-75.
35. Rogerson, F.M. and P.J. Fuller, *Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor*. *Mol Cell Endocrinol*, 2003. **200**(1-2): p. 45-55.
36. Viengchareun, S., D. Le Menuet, L. Martinerie, M. Munier, L. Pascual-Le Tallec, and M. Lombes, *The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology*. *Nucl Recept Signal*, 2007. **5**: p. e012.
37. Pascual-Le Tallec, L. and M. Lombes, *The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(9): p. 2211-21.
38. Savory, J.G., G.G. Prefontaine, C. Lamprecht, M. Liao, R.F. Walther, Y.A. Lefebvre, and R.J. Hache, *Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(3): p. 781-93.
39. Grossmann, C., S. Ruhs, L. Langenbruch, S. Mildemberger, N. Stratz, K. Schumann, and M. Gekle, *Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling*. *Chem Biol*, 2012. **19**(6): p. 742-51.
40. Williams, J.S. and G.H. Williams, *50th anniversary of aldosterone*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(6): p. 2364-72.
41. Lim-Tio, S.S., M.C. Keightley, and P.J. Fuller, *Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor*. *Endocrinology*, 1997. **138**(6): p. 2537-43.
42. Albiston, A.L., V.R. Obeyesekere, R.E. Smith, and Z.S. Krozowski, *Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme*. *Mol Cell Endocrinol*, 1994. **105**(2): p. R11-7.
43. Edwards, C.R., P.M. Stewart, D. Burt, L. Brett, M.A. McIntyre, W.S. Sutanto, E.R. de Kloet, and C. Monder, *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor*. *Lancet*, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
44. Funder, J.W., P.T. Pearce, R. Smith, and J. Campbell, *Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors*. *Endocrinology*, 1989. **125**(4): p. 2224-6.
45. Yang, J. and P.J. Fuller, *Interactions of the mineralocorticoid receptor--within and without*. *Mol Cell Endocrinol*, 2011. **350**(2): p. 196-205.
46. Grossmann, C., A.W. Krug, R. Freudinger, S. Mildemberger, K. Voelker, and M. Gekle, *Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007. **292**(6): p. E1790-800.
47. Meinel, S., S. Ruhs, K. Schumann, N. Stratz, K. Trenkmann, B. Schreier, I. Grosse, J. Keilwagen, M. Gekle, and C. Grossmann, *Mineralocorticoid receptor interaction with*

- SP1 generates a new response element for pathophysiologically relevant gene expression.* Nucleic Acids Res, 2013. **41**(17): p. 8045-60.
48. Funder, J.W., *Is aldosterone bad for the heart?* Trends Endocrinol Metab, 2004. **15**(4): p. 139-42.
 49. Pitt, B., N. Reichek, R. Willenbrock, F. Zannad, R.A. Phillips, B. Roniker, J. Kleiman, S. Krause, D. Burns, and G.H. Williams, *Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study.* Circulation, 2003. **108**(15): p. 1831-8.
 50. Pitt, B., W. Remme, F. Zannad, J. Neaton, F. Martinez, B. Roniker, R. Bittman, S. Hurley, J. Kleiman, and M. Gatlin, *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.* N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
 51. Pitt, B., F. Zannad, W.J. Remme, R. Cody, A. Castaigne, A. Perez, J. Palensky, and J. Wittes, *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators.* N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
 52. Grossmann, C. and M. Gekle, *New aspects of rapid aldosterone signaling.* Mol Cell Endocrinol, 2009. **308**(1-2): p. 53-62.
 53. Farman, N. and M.E. Rafestin-Oblin, *Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity.* Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(2): p. F181-92.
 54. Krozowski, Z. and J.W. Funder, *Mineralocorticoid receptors in the rat lung.* Endocrinology, 1981. **109**(6): p. 1811-3.
 55. Odermatt, A. and D.V. Kratschmar, *Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: an overview.* Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 168-86.
 56. Booth, R.E., J.P. Johnson, and J.D. Stockand, *Aldosterone.* Adv Physiol Educ, 2002. **26**(1-4): p. 8-20.
 57. Bens, M., C. Chassin, and A. Vandewalle, *Regulation of NaCl transport in the renal collecting duct: lessons from cultured cells.* Pflugers Arch, 2006. **453**(2): p. 133-46.
 58. Lang, F. and E. Shumilina, *Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1.* FASEB J, 2013. **27**(1): p. 3-12.
 59. Mastroberardino, L., B. Spindler, I. Forster, J. Loffing, R. Assandri, A. May, and F. Verrey, *Ras pathway activates epithelial Na⁺ channel and decreases its surface expression in Xenopus oocytes.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(12): p. 3417-27.
 60. Rogerson, F.M., F.E. Brennan, and P.J. Fuller, *Mineralocorticoid receptor binding, structure and function.* Mol Cell Endocrinol, 2004. **217**(1-2): p. 203-12.
 61. Soundararajan, R., T.T. Zhang, J. Wang, A. Vandewalle, and D. Pearce, *A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport.* J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 39970-81.
 62. Feraille, E., D. Mordasini, S. Gonin, G. Deschenes, M. Vinciguerra, A. Doucet, A. Vandewalle, V. Summa, F. Verrey, and P.Y. Martin, *Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **986**: p. 570-8.
 63. Kolla, V. and G. Litwack, *Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor.* Mol Cell Biochem, 2000. **204**(1-2): p. 35-40.
 64. Bens, M., V. Vallet, F. Cluzeaud, L. Pascual-Letallec, A. Kahn, M.E. Rafestin-Oblin, B.C. Rossier, and A. Vandewalle, *Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel*

- immortalized mouse collecting duct principal cell line*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(5): p. 923-34.
65. Epple, H.J., S. Amasheh, J. Mankertz, M. Goltz, J.D. Schulzke, and M. Fromm, *Early aldosterone effect in distal colon by transcriptional regulation of ENaC subunits*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **278**(5): p. G718-24.
 66. Masilamani, S., G.H. Kim, C. Mitchell, J.B. Wade, and M.A. Knepper, *Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. R19-23.
 67. Beesley, A.H., D. Hornby, and S.J. White, *Regulation of distal nephron K⁺ channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney*. J Physiol, 1998. **509** (Pt 3): p. 629-34.
 68. Fodstad, H., E. Gonzalez-Rodriguez, S. Bron, H. Gaeggeler, B. Guisan, B.C. Rossier, and J.D. Horisberger, *Effects of mineralocorticoid and K⁺ concentration on K⁺ secretion and ROMK channel expression in a mouse cortical collecting duct cell line*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(5): p. F966-75.
 69. Singh, S.K., B. O'Hara, J.R. Talukder, and V.M. Rajendran, *Aldosterone induces active K(+) secretion by enhancing mucosal expression of Kcnn4c and Kcnma1 channels in rat distal colon*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(9): p. C1353-60.
 70. Wald, H., H. Garty, L.G. Palmer, and M.M. Popovtzer, *Differential regulation of ROMK expression in kidney cortex and medulla by aldosterone and potassium*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 2): p. F239-45.
 71. Dooley, R., B.J. Harvey, and W. Thomas, *Non-genomic actions of aldosterone: from receptors and signals to membrane targets*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 223-34.
 72. Funder, J.W., *The nongenomic actions of aldosterone*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 313-21.
 73. Le Moellic, C., A. Ouvrard-Pascaud, C. Capurro, F. Cluzeaud, M. Fay, F. Jaisser, N. Farman, and M. Blot-Chabaud, *Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKCalpha activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(5): p. 1145-60.
 74. Grossmann, C., A. Benesic, A.W. Krug, R. Freudinger, S. Mildenerger, B. Gassner, and M. Gekle, *Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(7): p. 1697-710.
 75. Pfau, A., C. Grossmann, R. Freudinger, S. Mildenerger, A. Benesic, and M. Gekle, *Ca²⁺ but not H₂O₂ modulates GRE-element activation by the human mineralocorticoid receptor in HEK cells*. Mol Cell Endocrinol, 2007. **264**(1-2): p. 35-43.
 76. Skott, O., T.R. Uhrenholt, J. Schjerning, P.B. Hansen, L.E. Rasmussen, and B.L. Jensen, *Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease--friend or foe?* Pharmacol Ther, 2006. **111**(2): p. 495-507.
 77. Mutoh, A., M. Isshiki, and T. Fujita, *Aldosterone enhances ligand-stimulated nitric oxide production in endothelial cells*. Hypertens Res, 2008. **31**(9): p. 1811-20.
 78. Arima, S., K. Kohagura, H.L. Xu, A. Sugawara, T. Abe, F. Satoh, K. Takeuchi, and S. Ito, *Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(9): p. 2255-63.
 79. Arima, S., K. Kohagura, H.L. Xu, A. Sugawara, A. Uruno, F. Satoh, K. Takeuchi, and S. Ito, *Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole*. Hypertension, 2004. **43**(2): p. 352-7.

80. Gros, R., Q. Ding, S. Armstrong, C. O'Neil, J.G. Pickering, and R.D. Feldman, *Rapid effects of aldosterone on clonal human vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(2): p. C788-94.
81. Schmidt, B.M., S. Oehmer, C. Delles, R. Bratke, M.P. Schneider, A. Klingbeil, E.H. Fleischmann, and R.E. Schmieder, *Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature*. Hypertension, 2003. **42**(2): p. 156-60.
82. Iwashima, F., T. Yoshimoto, I. Minami, M. Sakurada, Y. Hirono, and Y. Hirata, *Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1009-14.
83. Leopold, J.A., A. Dam, B.A. Maron, A.W. Scribner, R. Liao, D.E. Handy, R.C. Stanton, B. Pitt, and J. Loscalzo, *Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 189-97.
84. Liu, S.L., S. Schmuck, J.Z. Chorzyczewski, R. Gros, and R.D. Feldman, *Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation*. Circulation, 2003. **108**(19): p. 2400-6.
85. Schmidt, B.M., U. Sammer, I. Fleischmann, M. Schlaich, C. Delles, and R.E. Schmieder, *Rapid nongenomic effects of aldosterone on the renal vasculature in humans*. Hypertension, 2006. **47**(4): p. 650-5.
86. Mihailidou, A.S., M. Mardini, and J.W. Funder, *Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C*. Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 773-80.
87. Barbato, J.C., S. Rashid, P.J. Mulrow, J.I. Shapiro, and R. Franco-Saenz, *Mechanisms for aldosterone and spironolactone-induced positive inotropic actions in the rat heart*. Hypertension, 2004. **44**(5): p. 751-7.
88. Rude, M.K., T.A. Duhaney, G.M. Kuster, S. Judge, J. Heo, W.S. Colucci, D.A. Siwik, and F. Sam, *Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes*. Hypertension, 2005. **46**(3): p. 555-61.
89. Fujita, M., T. Minamino, H. Asanuma, S. Sanada, A. Hirata, M. Wakeno, M. Myoishi, H. Okuda, A. Ogai, K. Okada, O. Tsukamoto, H. Koyama, M. Hori, and M. Kitakaze, *Aldosterone nongenomically worsens ischemia via protein kinase C-dependent pathways in hypoperfused canine hearts*. Hypertension, 2005. **46**(1): p. 113-7.
90. Sugiyama, T., T. Yoshimoto, K. Tsuchiya, N. Gochou, Y. Hirono, T. Tateno, N. Fukai, M. Shichiri, and Y. Hirata, *Aldosterone induces angiotensin converting enzyme gene expression via a JAK2-dependent pathway in rat endothelial cells*. Endocrinology, 2005. **146**(9): p. 3900-6.
91. Lalevee, N., M.C. Rebsamen, S. Barrere-Lemaire, E. Perrier, J. Nargeot, J.P. Benitah, and M.F. Rossier, *Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(2): p. 216-24.
92. Jaffe, I.Z., B.G. Newfell, M. Aronovitz, N.N. Mohammad, A.P. McGraw, R.E. Perreault, P. Carmeliet, A. Ehsan, and M.E. Mendelsohn, *Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3891-900.
93. McGraw, A.P., J. Bagley, W.S. Chen, C. Galayda, H. Nickerson, A. Armani, M. Caprio, P. Carmeliet, and I.Z. Jaffe, *Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(1): p. e000018.

94. Pojoga, L.H., P. Coutinho, A. Rivera, T.M. Yao, E.R. Maldonado, R. Youte, G.K. Adler, J. Williams, A. Turchin, G.H. Williams, and J.R. Romero, *Activation of the mineralocorticoid receptor increases striatin levels*. Am J Hypertens, 2012. **25**(2): p. 243-9.
95. Batenburg, W.W., P.M. Jansen, A.J. van den Bogaerdt, and J.D. AH, *Angiotensin II-aldosterone interaction in human coronary microarteries involves GPR30, EGFR, and endothelial NO synthase*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(1): p. 136-43.
96. Gros, R., Q. Ding, B. Liu, J. Chorazyczewski, and R.D. Feldman, *ALDOSTERONE MEDIATES ITS RAPID EFFECTS IN VASCULAR ENDOTHELIAL CELLS THROUGH GPER/GPR30 ACTIVATION*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013.
97. Gros, R., Q. Ding, L.A. Sklar, E.E. Prossnitz, J.B. Arterburn, J. Chorazyczewski, and R.D. Feldman, *GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 442-51.
98. Suh, P.G., J.I. Park, L. Manzoli, L. Cocco, J.C. Peak, M. Katan, K. Fukami, T. Kataoka, S. Yun, and S.H. Ryu, *Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes*. BMB Rep, 2008. **41**(6): p. 415-34.
99. Ushio-Fukai, M., R.W. Alexander, M. Akers, P.R. Lyons, B. Lassegue, and K.K. Griendling, *Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells*. Mol Pharmacol, 1999. **55**(1): p. 142-9.
100. Steinberg, S.F., *Cardiac actions of protein kinase C isoforms*. Physiology (Bethesda), 2012. **27**(3): p. 130-9.
101. Ushio-Fukai, M., K.K. Griendling, M. Akers, P.R. Lyons, and R.W. Alexander, *Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alphaq/11, alpha12, and beta gamma G protein subunits*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19772-7.
102. Kozasa, T. and A.G. Gilman, *Protein kinase C phosphorylates G12 alpha and inhibits its interaction with G beta gamma*. J Biol Chem, 1996. **271**(21): p. 12562-7.
103. Seshiah, P.N., D.S. Weber, P. Rocic, L. Valppu, Y. Taniyama, and K.K. Griendling, *Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators*. Circ Res, 2002. **91**(5): p. 406-13.
104. Touyz, R.M., *Recent advances in intracellular signalling in hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003. **12**(2): p. 165-74.
105. Liebmann, C., *Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity*. Cell Signal, 2001. **13**(11): p. 777-85.
106. Christ, M., C. Meyer, K. Sippel, and M. Wehling, *Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **213**(1): p. 123-9.
107. Markos, F., V. Healy, and B.J. Harvey, *Aldosterone rapidly activates Na⁺/H⁺ exchange in M-1 cortical collecting duct cells via a PKC-MAPK pathway*. Nephron Physiol, 2005. **99**(1): p. p1-9.
108. Alzamora, R., L.R. Brown, and B.J. Harvey, *Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by aldosterone and 17beta-estradiol*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(11): p. 2637-50.
109. Harvey, B.J., C.M. Doolan, S.B. Condliffe, C. Renard, R. Alzamora, and V. Urbach, *Non-genomic convergent and divergent signalling of rapid responses to aldosterone and estradiol in mammalian colon*. Steroids, 2002. **67**(6): p. 483-91.

110. McEneaney, V., B.J. Harvey, and W. Thomas, *Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **107**(3-5): p. 180-90.
111. McEneaney, V., B.J. Harvey, and W. Thomas, *Aldosterone regulates rapid trafficking of epithelial sodium channel subunits in renal cortical collecting duct cells via protein kinase D activation*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(4): p. 881-92.
112. Doolan, C.M. and B.J. Harvey, *Modulation of cytosolic protein kinase C and calcium ion activity by steroid hormones in rat distal colon*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8763-7.
113. Harvey, B.J. and M. Higgins, *Nongenomic effects of aldosterone on Ca²⁺ in M-1 cortical collecting duct cells*. Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1395-403.
114. Kagiya, S., S. Eguchi, G.D. Frank, T. Inagami, Y.C. Zhang, and M.I. Phillips, *Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 909-12.
115. Kagiya, S., K. Qian, T. Kagiya, and M.I. Phillips, *Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy*. Hypertension, 2003. **41**(3 Pt 2): p. 824-9.
116. Shimizu-Hirota, R., H. Sasamura, M. Mifune, H. Nakaya, M. Kuroda, M. Hayashi, and T. Saruta, *Regulation of vascular proteoglycan synthesis by angiotensin II type 1 and type 2 receptors*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(12): p. 2609-15.
117. Francois, H., S. Placier, M. Flamant, P.L. Tharaux, D. Chansel, J.C. Dussaule, and C. Chatziantoniou, *Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 926-8.
118. Terzi, F., M. Burtin, M. Hekmati, P. Federici, G. Grimber, P. Briand, and G. Friedlander, *Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 225-34.
119. Blobel, C.P., *ADAMs: key components in EGFR signalling and development*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 32-43.
120. Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch, and A. Ullrich, *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*. Nature, 1999. **402**(6764): p. 884-8.
121. Lefkowitz, R.J., K. Rajagopal, and E.J. Whalen, *New roles for beta-arrestins in cell signaling: not just for seven-transmembrane receptors*. Mol Cell, 2006. **24**(5): p. 643-52.
122. Sato, K., *Cellular Functions Regulated by Phosphorylation of EGFR on Tyr845*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): p. 10761-90.
123. Prenzel, N., O.M. Fischer, S. Streit, S. Hart, and A. Ullrich, *The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(1): p. 11-31.
124. Olivares-Reyes, J.A., B.H. Shah, J. Hernandez-Aranda, A. Garcia-Caballero, M.P. Farshori, J.A. Garcia-Sainz, and K.J. Catt, *Agonist-induced interactions between angiotensin AT1 and epidermal growth factor receptors*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(2): p. 356-64.
125. Ishizaka, N., K.K. Griendling, B. Lassegue, and R.W. Alexander, *Angiotensin II type 1 receptor: relationship with caveolae and caveolin after initial agonist stimulation*. Hypertension, 1998. **32**(3): p. 459-66.
126. Takaguri, A., H. Shirai, K. Kimura, A. Hinoki, K. Eguchi, M. Carlile-Klusacek, B. Yang, V. Rizzo, and S. Eguchi, *Caveolin-1 negatively regulates a metalloprotease-*

- dependent epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(3): p. 545-51.
127. Grossmann, C. and M. Gekle, *Interaction between mineralocorticoid receptor and epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **350**(2): p. 235-41.
 128. Goi, T., M. Shipitsin, Z. Lu, D.A. Foster, S.G. Klinz, and L.A. Feig, *An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity*. EMBO J, 2000. **19**(4): p. 623-30.
 129. Min, L.J., M. Mogi, J.M. Li, J. Iwanami, M. Iwai, and M. Horiuchi, *Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **97**(5): p. 434-42.
 130. Montezano, A.C., G.E. Callera, A. Yogi, Y. He, R.C. Tostes, G. He, E.L. Schiffrin, and R.M. Touyz, *Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(8): p. 1511-8.
 131. Mazak, I., A. Fiebeler, D.N. Muller, J.K. Park, E. Shagdarsuren, C. Lindschau, R. Dechend, C. Viedt, B. Pilz, H. Haller, and F.C. Luft, *Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2792-800.
 132. Callera, G.E., R.M. Touyz, R.C. Tostes, A. Yogi, Y. He, S. Malkinson, and E.L. Schiffrin, *Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src*. Hypertension, 2005. **45**(4): p. 773-9.
 133. Gekle, M., R. Freudinger, S. Mildenerger, and S. Silbernagl, *Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **282**(4): p. F669-79.
 134. Krug, A.W., C. Schuster, B. Gassner, R. Freudinger, S. Mildenerger, J. Troppmair, and M. Gekle, *Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45892-7.
 135. Griol-Charhbil, V., C. Fassot, S. Messaoudi, C. Perret, V. Agrapart, and F. Jaisser, *Epidermal growth factor receptor mediates the vascular dysfunction but not the remodeling induced by aldosterone/salt*. Hypertension. **57**(2): p. 238-44.
 136. Huang, S., A. Zhang, G. Ding, and R. Chen, *Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(6): p. F1323-33.
 137. Santiskulvong, C. and E. Rozengurt, *Protein kinase Calpha mediates feedback inhibition of EGF receptor transactivation induced by Gq-coupled receptor agonists*. Cell Signal, 2007. **19**(6): p. 1348-57.
 138. Beier, I., R. Dusing, H. Vetter, and U. Schmitz, *Epidermal growth factor stimulates Rac1 and p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2008. **196**(1): p. 92-7.
 139. Fujita, T., *Mineralocorticoid receptors, salt-sensitive hypertension, and metabolic syndrome*. Hypertension, 2010. **55**(4): p. 813-8.
 140. Shibata, S., M. Nagase, S. Yoshida, W. Kawarazaki, H. Kurihara, H. Tanaka, J. Miyoshi, Y. Takai, and T. Fujita, *Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease*. Nat Med, 2008. **14**(12): p. 1370-6.

141. Grossmann, C., B. Husse, S. Mildenerger, B. Schreier, K. Schuman, and M. Gekle, *Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1803**(5): p. 584-90.
142. Dorrance, A.M., H.L. Osborn, R. Grekin, and R.C. Webb, *Spironolactone reduces cerebral infarct size and EGF-receptor mRNA in stroke-prone rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. **281**(3): p. R944-50.
143. Grossmann, C., R. Freudinger, S. Mildenerger, A.W. Krug, and M. Gekle, *Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(6): p. F1226-31.
144. Krug, A.W., C. Grossmann, C. Schuster, R. Freudinger, S. Mildenerger, M.V. Govindan, and M. Gekle, *Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(44): p. 43060-6.
145. Nakano, S., N. Kobayashi, K. Yoshida, T. Ohno, and H. Matsuoka, *Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats*. *Hypertens Res*, 2005. **28**(11): p. 925-36.
146. Robinson, M.J. and M.H. Cobb, *Mitogen-activated protein kinase pathways*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(2): p. 180-6.
147. McCubrey, J.A., L.S. Steelman, W.H. Chappell, S.L. Abrams, E.W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D.M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri, F. Stivala, M. Libra, J. Basecke, C. Evangelisti, A.M. Martelli, and R.A. Franklin, *Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(8): p. 1263-84.
148. Lee, M.H., H.M. El-Shewy, D.K. Luttrell, and L.M. Luttrell, *Role of beta-arrestin-mediated desensitization and signaling in the control of angiotensin AT1a receptor-stimulated transcription*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(4): p. 2088-97.
149. Li, X., J.W. Lee, L.M. Graves, and H.S. Earp, *Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway*. *EMBO J*, 1998. **17**(9): p. 2574-83.
150. Tian, Y., R.D. Smith, T. Balla, and K.J. Catt, *Angiotensin II activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C and Ras/Raf-1 kinase in bovine adrenal glomerulosa cells*. *Endocrinology*, 1998. **139**(4): p. 1801-9.
151. Turner, N.A., S.G. Ball, and A.J. Balmforth, *The mechanism of angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase-1/2 activation is independent of angiotensin AT(1A) receptor internalisation*. *Cell Signal*, 2001. **13**(4): p. 269-77.
152. Uchiyama-Tanaka, Y., H. Matsubara, Y. Nozawa, S. Murasawa, Y. Mori, A. Kosaki, K. Maruyama, H. Masaki, Y. Shibasaki, S. Fujiyama, A. Nose, O. Iba, T. Hasagawa, E. Tateishi, S. Higashiyama, and T. Iwasaka, *Angiotensin II signaling and HB-EGF shedding via metalloproteinase in glomerular mesangial cells*. *Kidney Int*, 2001. **60**(6): p. 2153-63.
153. Ahn, S., S.K. Shenoy, H. Wei, and R.J. Lefkowitz, *Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(34): p. 35518-25.
154. Wei, H., S. Ahn, S.K. Shenoy, S.S. Karnik, L. Hunyady, L.M. Luttrell, and R.J. Lefkowitz, *Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(19): p. 10782-7.

155. Zou, Y., I. Komuro, T. Yamazaki, R. Aikawa, S. Kudoh, I. Shiojima, Y. Hiroi, T. Mizuno, and Y. Yazaki, *Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes.* J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33592-7.
156. Olson, E.R., P.E. Shamhart, J.E. Naugle, and J.G. Meszaros, *Angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation is mediated by protein kinase Cdelta and intracellular calcium in adult rat cardiac fibroblasts.* Hypertension, 2008. **51**(3): p. 704-11.
157. Shah, B.H. and K.J. Catt, *Calcium-independent activation of extracellularly regulated kinases 1 and 2 by angiotensin II in hepatic C9 cells: roles of protein kinase Cdelta, Src/proline-rich tyrosine kinase 2, and epidermal growth receptor trans-activation.* Mol Pharmacol, 2002. **61**(2): p. 343-51.
158. Liao, D.F., B. Monia, N. Dean, and B.C. Berk, *Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells.* J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6146-50.
159. Eguchi, S., K. Numaguchi, H. Iwasaki, T. Matsumoto, T. Yamakawa, H. Utsunomiya, E.D. Motley, H. Kawakatsu, K.M. Owada, Y. Hirata, F. Marumo, and T. Inagami, *Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 8890-6.
160. Shah, B.H., A. Yesilkaya, J.A. Olivares-Reyes, H.D. Chen, L. Hunyady, and K.J. Catt, *Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(8): p. 2035-48.
161. Thomas, W.G., Y. Brandenburger, D.J. Autelitano, T. Pham, H. Qian, and R.D. Hannan, *Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor.* Circ Res, 2002. **90**(2): p. 135-42.
162. Escano, C.S., Jr., L.B. Keever, A.A. Gutweiler, and B.T. Andresen, *Angiotensin II activates extracellular signal-regulated kinase independently of receptor tyrosine kinases in renal smooth muscle cells: implications for blood pressure regulation.* J Pharmacol Exp Ther, 2008. **324**(1): p. 34-42.
163. Murasawa, S., Y. Mori, Y. Nozawa, H. Masaki, K. Maruyama, Y. Tsutsumi, Y. Moriguchi, Y. Shibasaki, Y. Tanaka, T. Iwasaka, M. Inada, and H. Matsubara, *Role of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2/CAKbeta/RAFTK in angiotensin II induced Ras/ERK signaling.* Hypertension, 1998. **32**(4): p. 668-75.
164. Grossmann, C., R. Freudinger, S. Mildenerger, B. Husse, and M. Gekle, *EF domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions.* J Biol Chem, 2008. **283**(11): p. 7109-16.
165. McEaney, V., R. Dooley, B.J. Harvey, and W. Thomas, *Protein kinase D stabilizes aldosterone-induced ERK1/2 MAP kinase activation in M1 renal cortical collecting duct cells to promote cell proliferation.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **118**(1-2): p. 18-28.
166. Nagai, Y., K. Miyata, G.P. Sun, M. Rahman, S. Kimura, A. Miyatake, H. Kiyomoto, M. Kohno, Y. Abe, M. Yoshizumi, and A. Nishiyama, *Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts.* Hypertension, 2005. **46**(4): p. 1039-45.

167. Gekle, M., R. Freudinger, S. Mildenerger, K. Schenk, I. Marschitz, and H. Schramek, *Rapid activation of Na⁺/H⁺-exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinase ERK1/2*. *Pflugers Arch*, 2001. **441**(6): p. 781-6.
168. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 259-68.
169. Fellner, S.K. and W.J. Arendshorst, *Angiotensin II, reactive oxygen species, and Ca²⁺ signaling in afferent arterioles*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005. **289**(5): p. F1012-9.
170. Fellner, S.K. and W.J. Arendshorst, *Angiotensin II-stimulated Ca²⁺ entry mechanisms in afferent arterioles: role of transient receptor potential canonical channels and reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **294**(1): p. F212-9.
171. Touyz, R.M., G. He, L.Y. Deng, and E.L. Schiffrin, *Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries*. *Circulation*, 1999. **99**(3): p. 392-9.
172. Doolan, C.M. and B.J. Harvey, *Rapid effects of steroid hormones on free intracellular calcium in T84 colonic epithelial cells*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(6 Pt 1): p. C1935-41.
173. Gekle, M., N. Golenhofen, H. Oberleithner, and S. Silbernagl, *Rapid activation of Na⁺/H⁺ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca²⁺ and stimulation of a plasma membrane proton conductance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(19): p. 10500-4.
174. Wehling, M., A. Ulsenheimer, M. Schneider, C. Neylon, and M. Christ, *Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **204**(2): p. 475-81.
175. Christ, M., K. Douwes, C. Eisen, G. Bechtner, K. Theisen, and M. Wehling, *Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells*. *Hypertension*, 1995. **25**(1): p. 117-23.
176. Wehling, M., C.B. Neylon, M. Fullerton, A. Bobik, and J.W. Funder, *Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1995. **76**(6): p. 973-9.
177. Haseroth, K., D. Gerdes, S. Berger, M. Feuring, A. Gunther, C. Herbst, M. Christ, and M. Wehling, *Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **266**(1): p. 257-61.
178. Silvestre, J.S., C. Heymes, A. Oubenaissa, V. Robert, B. Aupetit-Faisant, A. Carayon, B. Swynghedauw, and C. Delcayre, *Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis*. *Circulation*, 1999. **99**(20): p. 2694-701.
179. Xiao, F., J.R. Puddefoot, and G.P. Vinson, *Aldosterone mediates angiotensin II-stimulated rat vascular smooth muscle cell proliferation*. *J Endocrinol*, 2000. **165**(2): p. 533-6.
180. Harada, E., M. Yoshimura, H. Yasue, O. Nakagawa, M. Nakagawa, M. Harada, Y. Mizuno, M. Nakayama, Y. Shimasaki, T. Ito, S. Nakamura, K. Kuwahara, Y. Saito, K. Nakao, and H. Ogawa, *Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes*. *Circulation*, 2001. **104**(2): p. 137-9.
181. Hirono, Y., T. Yoshimoto, N. Suzuki, T. Sugiyama, M. Sakurada, S. Takai, N. Kobayashi, M. Shichiri, and Y. Hirata, *Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension: the possible role of local renin-angiotensin system*. *Endocrinology*, 2007. **148**(4): p. 1688-96.

182. Michel, F., M.L. Ambroisine, M. Duriez, C. Delcayre, B.I. Levy, and J.S. Silvestre, *Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway*. *Circulation*, 2004. **109**(16): p. 1933-7.
183. Robert, V., C. Heymes, J.S. Silvestre, A. Sabri, B. Swynghedauw, and C. Delcayre, *Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis*. *Hypertension*, 1999. **33**(4): p. 981-6.
184. Ullian, M.E., L.G. Walsh, and T.A. Morinelli, *Potentiation of angiotensin II action by corticosteroids in vascular tissue*. *Cardiovasc Res*, 1996. **32**(2): p. 266-73.
185. Ullian, M.E., J.R. Schelling, and S.L. Linas, *Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses*. *Hypertension*, 1992. **20**(1): p. 67-73.
186. Xiao, F., J.R. Puddefoot, S. Barker, and G.P. Vinson, *Mechanism for aldosterone potentiation of angiotensin II-stimulated rat arterial smooth muscle cell proliferation*. *Hypertension*, 2004. **44**(3): p. 340-5.
187. Guo, D.F., S. Uno, and T. Inagami, *Steroid hormones upregulate rat angiotensin II type IA receptor gene: role of glucocorticoid responsive elements in rat angiotensin II type IA promoter*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995. **53**(1-6): p. 69-73.
188. Stas, S., A. Whaley-Connell, J. Habibi, L. Appesh, M.R. Hayden, P.R. Karuparthi, M. Qazi, E.M. Morris, S.A. Cooper, C.D. Link, C. Stump, M. Hay, C. Ferrario, and J.R. Sowers, *Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling*. *Endocrinology*, 2007. **148**(8): p. 3773-80.
189. Chai, W., I.M. Garrelds, R. de Vries, W.W. Batenburg, J.P. van Kats, and A.H. Danser, *Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II*. *Hypertension*, 2005. **46**(4): p. 701-6.
190. Min, L.J., M. Mogi, J. Iwanami, J.M. Li, A. Sakata, T. Fujita, K. Tsukuda, M. Iwai, and M. Horiuchi, *Cross-talk between aldosterone and angiotensin II in vascular smooth muscle cell senescence*. *Cardiovasc Res*, 2007. **76**(3): p. 506-16.
191. Kushibiki, M., M. Yamada, K. Oikawa, H. Tomita, T. Osanai, and K. Okumura, *Aldosterone causes vasoconstriction in coronary arterioles of rats via angiotensin II type-1 receptor: influence of hypertension*. *Eur J Pharmacol*, 2007. **572**(2-3): p. 182-8.
192. Yamada, M., M. Kushibiki, T. Osanai, H. Tomita, and K. Okumura, *Vasoconstrictor effect of aldosterone via angiotensin II type 1 (AT1) receptor: possible role of AT1 receptor dimerization*. *Cardiovasc Res*, 2008. **79**(1): p. 169-78.
193. Lemarie, C.A., S.M. Simeone, A. Nikonova, T. Ebrahimian, M.E. Deschenes, T.M. Coffman, P. Paradis, and E.L. Schiffrin, *Aldosterone-induced activation of signaling pathways requires activity of angiotensin type 1a receptors*. *Circ Res*, 2009. **105**(9): p. 852-9.
194. Fiebeler, A., J. Nussberger, E. Shagdarsuren, S. Rong, G. Hilfenhaus, N. Al-Saadi, R. Dechend, M. Wellner, S. Meiners, C. Maser-Gluth, A.Y. Jeng, R.L. Webb, F.C. Luft, and D.N. Muller, *Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage*. *Circulation*, 2005. **111**(23): p. 3087-94.
195. Fiebeler, A., F. Schmidt, D.N. Muller, J.K. Park, R. Dechend, M. Bieringer, E. Shagdarsuren, V. Breu, H. Haller, and F.C. Luft, *Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury*. *Hypertension*, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 787-93.
196. Nishioka, T., M. Suzuki, K. Onishi, N. Takakura, H. Inada, T. Yoshida, M. Hiroe, and K. Imanaka-Yoshida, *Eplerenone attenuates myocardial fibrosis in the angiotensin II-*

- induced hypertensive mouse: involvement of tenascin-C induced by aldosterone-mediated inflammation.* J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **49**(5): p. 261-8.
197. Rocha, R., C.L. Martin-Berger, P. Yang, R. Scherrer, J. Delyani, and E. McMahon, *Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart.* Endocrinology, 2002. **143**(12): p. 4828-36.
 198. Viridis, A., M.F. Neves, F. Amiri, E. Viel, R.M. Touyz, and E.L. Schiffrin, *Spiroonolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress.* Hypertension, 2002. **40**(4): p. 504-10.
 199. Di Zhang, A., A. Nguyen Dinh Cat, C. Soukaseum, B. Escoubet, A. Cherfa, S. Messaoudi, C. Delcayre, J.L. Samuel, and F. Jaisser, *Cross-talk between mineralocorticoid and angiotensin II signaling for cardiac remodeling.* Hypertension, 2008. **52**(6): p. 1060-7.
 200. Luther, J.M., J.V. Gainer, L.J. Murphey, C. Yu, D.E. Vaughan, J.D. Morrow, and N.J. Brown, *Angiotensin II induces interleukin-6 in humans through a mineralocorticoid receptor-dependent mechanism.* Hypertension, 2006. **48**(6): p. 1050-7.
 201. Jaffe, I.Z. and M.E. Mendelsohn, *Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells.* Circ Res, 2005. **96**(6): p. 643-50.
 202. Zannad, F., J.J. McMurray, H. Krum, D.J. van Veldhuisen, K. Swedberg, H. Shi, J. Vincent, S.J. Pocock, and B. Pitt, *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms.* N Engl J Med, 2011. **364**(1): p. 11-21.
 203. Lemarie, C.A., P. Paradis, and E.L. Schiffrin, *New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone.* J Mol Med (Berl), 2008. **86**(6): p. 673-8.
 204. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Networking between systemic angiotensin II and cardiac mineralocorticoid receptors.* Hypertension, 2008. **52**(6): p. 1016-8.
 205. Rautureau, Y., P. Paradis, and E.L. Schiffrin, *Cross-talk between aldosterone and angiotensin signaling in vascular smooth muscle cells.* Steroids, 2011. **76**(9): p. 834-9.
 206. Shaw, G., S. Morse, M. Ararat, and F.L. Graham, *Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells.* FASEB J, 2002. **16**(8): p. 869-71.
 207. Felgner, P.L., T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, and M. Danielsen, *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
 208. Sagara, Y., F. Fernandez-Belda, L. de Meis, and G. Inesi, *Characterization of the inhibition of intracellular Ca²⁺ transport ATPases by thapsigargin.* J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12606-13.
 209. Weber, K.T., *Aldosterone in congestive heart failure.* N Engl J Med, 2001. **345**(23): p. 1689-97.
 210. Lyngso, C., N. Erikstrup, and J.L. Hansen, *Functional interactions between 7TM receptors in the renin-angiotensin system--dimerization or crosstalk?* Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 203-12.
 211. Sato, K., T. Nagao, T. Iwasaki, Y. Nishihira, and Y. Fukami, *Src-dependent phosphorylation of the EGF receptor Tyr-845 mediates Stat-p21waf1 pathway in A431 cells.* Genes Cells, 2003. **8**(12): p. 995-1003.
 212. Shah, B.H., J.A. Olivares-Reyes, and K.J. Catt, *The protein kinase C inhibitor Go6976 [12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo(2,3-a)pyrrolo(3,4-c)-carbazole] potentiates agonist-induced mitogen-activated protein kinase*

- activation through tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(1): p. 184-94.
213. Couet, J., M. Sargiacomo, and M.P. Lisanti, *Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities.* *J Biol Chem*, 1997. **272**(48): p. 30429-38.
 214. Okamoto, T., A. Schlegel, P.E. Scherer, and M.P. Lisanti, *Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane.* *J Biol Chem*, 1998. **273**(10): p. 5419-22.
 215. Pojoga, L.H., J.R. Romero, T.M. Yao, P. Loutraris, V. Ricchiuti, P. Coutinho, C. Guo, N. Lapointe, J.R. Stone, G.K. Adler, and G.H. Williams, *Caveolin-1 ablation reduces the adverse cardiovascular effects of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester and angiotensin II.* *Endocrinology*, 2010. **151**(3): p. 1236-46.
 216. Sato, A., J.P. Liu, and J.W. Funder, *Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro.* *Endocrinology*, 1997. **138**(8): p. 3410-6.
 217. Ricchiuti, V., N. Lapointe, L. Pojoga, T. Yao, L. Tran, G.H. Williams, and G.K. Adler, *Dietary sodium intake regulates angiotensin II type 1, mineralocorticoid receptor, and associated signaling proteins in heart.* *J Endocrinol*, 2011. **211**(1): p. 47-54.
 218. Braun, S., R. Losel, M. Wehling, and B. Boldyreff, *Aldosterone rapidly activates Src kinase in M-1 cells involving the mineralocorticoid receptor and HSP84.* *FEBS Lett*, 2004. **570**(1-3): p. 69-72.
 219. Stancato, L.F., A.M. Silverstein, J.K. Owens-Grillo, Y.H. Chow, R. Jove, and W.B. Pratt, *The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase.* *J Biol Chem*, 1997. **272**(7): p. 4013-20.
 220. Ahsan, A., S.G. Ramanand, C. Whitehead, S.M. Hiniker, A. Rehemtulla, W.B. Pratt, S. Jolly, C. Gouveia, K. Truong, C. Van Waes, D. Ray, T.S. Lawrence, and M.K. Nyati, *Wild-type EGFR is stabilized by direct interaction with HSP90 in cancer cells and tumors.* *Neoplasia*, 2012. **14**(8): p. 670-7.
 221. Shimamura, T., A.M. Lowell, J.A. Engelman, and G.I. Shapiro, *Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins.* *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 6401-8.
 222. Xu, W., S. Soga, K. Beebe, M.J. Lee, Y.S. Kim, J. Trepel, and L. Neckers, *Sensitivity of epidermal growth factor receptor and ErbB2 exon 20 insertion mutants to Hsp90 inhibition.* *Br J Cancer*, 2007. **97**(6): p. 741-4.
 223. Zhang, T., Y. Li, Z. Zhu, M. Gu, B. Newman, and D. Sun, *MEK inhibition potentiates the activity of Hsp90 inhibitor 17-AAG against pancreatic cancer cells.* *Mol Pharm*, 2010. **7**(5): p. 1576-84.
 224. Mazalouskas, M.D., R. Godoy-Ruiz, D.J. Weber, D.B. Zimmer, R.E. Honkanen, and B.E. Wadzinski, *Small G proteins, Rac1 and Ras, regulate serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5)-extracellular signal-regulated (ERK) complexes involved in the feedback regulation of Raf1.* *J Biol Chem*, 2013.

8.Thesen

1. Im HEK293-Zellmodell mit transient transfiziertem humanem AT1R und humanem MR zeigte sich bei höheren Konzentrationen (Aldo 10 nM, AngII 100 nM) bei kurzer Inkubationszeit (5 min) kein Effekt einer zusätzlichen Gabe von Aldo auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung. Bei einer längeren Inkubation (30 min) war unter der gleichzeitigen Gabe von Aldo eine signifikant geringere ERK1/2-Phosphorylierung durch AngII zu verzeichnen, jedoch nur in Anwesenheit des MR. Bei geringen Konzentrationen (Aldo 100 pM, AngII 1 nM) war bei insgesamt schwachem Signal im Western Blot bei 5 min eine hemmende Wirkung, bei 30 min keine Veränderung des Effekts von AngII auf ERK1/2 durch eine Kombination mit Aldo zu beobachten.

2. Die Beobachtungen zur ERK1/2-Phosphorylierung in dem hier verwendeten definierten Zellmodell stehen im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen an VSMC in der Literatur, wo eine potenzierende Wirkung von Aldo/MR auf die AngII-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung beschrieben wurde. Mögliche Ursachen für diesen Widerspruch könnten im verwendeten Zellmodell selbst, den verwendeten Konzentrationen und den betrachteten Zeitpunkten liegen.

3. Eine denkbare Erklärung für den hemmenden Effekt von Aldo/MR könnte die Induktion einer übermäßigen Gegenregulation einer ERK1/2-Aktivierung bei gemeinsamer Einwirkung von AngII/AT1R und Aldo/MR sein. Mögliche Schaltstellen für eine Hemmwirkung von Aldo/MR sind u.a. der EGFR, Src, Membranprozesse, PKC-Isoformen und eine physische Modifikation des AT1R. Bei dem Effekt nach 30 min scheint die EGFR-Tyrosinkinase keine entscheidende Rolle zu spielen, da eine EGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch Aldo/MR nicht beeinträchtigt wird. Ebenso sind PMA-aktivierte PKC-Isoformen sowie Modifikationen von MEK und ERK1/2 eher nicht beteiligt, da durch Aldo/MR kein Einfluss auf eine PMA-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung zu verzeichnen ist.

4. Die konkreten Signalwege von AngII/AT1R zur Phosphorylierung von ERK1/2 im HEK293-Zellmodell bedürfen insbesondere bei 30 min noch einer weiteren Aufklärung. Denkbar sind unter anderem Wege unter Beteiligung bzw. Kombination von PKC-Isoformen, EGFR-Transaktivierung und β -Arrestin.

5. Aldo (10 nM) erhöht das Ausgangsniveau des intrazellulären Calciums vor Gabe von AngII (100 nM) und verkürzt die Zeit bis zum Eintreten eines AngII-induzierten Ca^{2+} -Peaks, hat aber ansonsten keinen signifikanten Einfluss auf die AngII/AT1R-induzierte kurzfristige Ca^{2+} -

Signalgebung. Die schnelle Calcium-Antwort auf AngII bietet unter den verwendeten Konzentrationen somit zunächst keinen Ansatz für eine Erklärung einer Wechselwirkung von AngII/AT1R und Aldo/MR.

6. Ein Effekt von Aldo bzw. AngII auf die Aktivität am GRE ist an ihren jeweiligen Rezeptor (MR bzw. AT1R) gebunden. Verschiedene Kombinationen von Aldo- und AngII-Konzentrationen führen in Anwesenheit des MR und AT1R in Summe zu einer Abnahme der Aktivität des MR am GRE im Vergleich zu einer alleinigen Gabe von Aldo. Dies ist am ehesten durch einen allgemein hemmenden Einfluss von AngII/AT1R auf die Aktivität am GRE bedingt. AngII hemmt auch die Aldo-induzierte Aktivität an weiteren Promotoren. Denkbare Ursachen für den hemmenden Effekt von AngII am GRE-Promotor sind z.B. eine ROS-Gegenregulation, die Aktivierung anderer Promotoren bei limitierter Kapazität des Transkriptionsapparats oder eine Wechselwirkung in Bezug auf ERK1/2.

7. Die relative Aktivierung des MR durch Aldo unter Berücksichtigung der hemmenden Wirkung von AngII/AT1R auf die basale Aktivität am GRE bleibt bei der Kombination mit AngII im Vergleich zu der Aktivierung durch eine alleinige Gabe von Aldo erhalten, bzw. ist zum Teil gesteigert.

8. Die durchgeführten Untersuchungen in einem definierten Zellmodell zeigen, dass die Anwesenheit von AT1R und MR hinreichend ist für eine hemmende, nicht jedoch für eine positive Interaktion. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die zugrunde liegenden Signalprozesse in HEK293-Zellen in ihrer Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit genauer zu charakterisieren.

Lebenslauf

Personendaten:

Name: Robert André Cuno
Geburtsdatum: 03.07.1975
Geburtsort: Berlin

Schulbildung:

1982-1995 Besuch der Grundschule am Wasserwerk, Klosterfeld-Grundschule und des Kant-Gymnasiums in Berlin

Hochschulbildung:

1996-2002 Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Humboldt-Universität zu Berlin
Abschluss Diplom-Kaufmann (2002)
2005-2012 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss Staatsexamen und Approbation als Arzt (2012)

Berufliche Laufbahn:

2002-2005 Verschiedene berufliche Tätigkeiten auf dem Gebiet der Wirtschaftsinformatik und des Betriebswirtschaftlichen Controllings
2012-2013 Assistenzarzt an der Inneren Klinik I, Ev. Waldkrankenhaus Berlin-Spandau

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, das ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Datum.....

Unterschrift.....

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Robert Cuno, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Datum.....

Unterschrift.....

Danksagung

Bei Herrn Professor Michael Gekle möchte ich mich für das interessante Thema bedanken und für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können.

Frau Jun. Prof. Dr. Dr. Claudia Großmann und Herrn Prof. Gekle danke ich beiden herzlich für die Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit. Ich habe mich bei ihnen stets fachlich und menschlich sehr gut aufgehoben gefühlt. Vielen Dank beiden für die Unterstützung bei allen wissenschaftlichen Fragen und für die motivierenden und aufmunternden Gespräche.

Frau Sigrid Mildenberger und Frau Katja Schumann danke ich für die engagierte Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methodik und bei der Durchführung der Versuche. Dem gesamten Laborteam danke ich für die gute Stimmung, die mich stets wieder aufgerichtet hat, wenn ich mal wieder kein Land zu sehen glaubte.

Danke an alle, die mich auf meinem Weg begleiten.