

Untersuchung der kardialen nichtgenomischen Effekte des Mineralokortikoidrezeptors im transgenen Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Sabrina Winter

geb. am 28.09.1981 in Oldenburg (Oldb)

Die vorliegende Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie von Juni 2009 bis Mai 2012 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie erstellt und aus Mitteln der Verbundförderung des Wilhelm-Roux-Programms der Medizinischen Fakultät (FGI ROUX Programm Projekt FKZ VF1/A2) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gefördert.

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. R. Neubert
2. Prof. Dr. med. J. Neumann
3. PD Dr. rer. nat. P. Boknik

Halle (Saale), 08.10.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Herzinsuffizienz.....	2
2.2 Physiologie und Pathophysiologie des Mineralokortikoidrezeptors (MR).....	5
2.3 Mausmodelle mit veränderter MR-Expression.....	11
2.4 Zielsetzung der Arbeit.....	13
3. Material und Methoden	15
3.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	15
3.1.1 Herstellung der Plasmide.....	15
3.1.2 Herstellung der transgenen Tiere.....	16
3.1.3 Isolierung genomischer DNA.....	18
3.1.4 Genotypisierung.....	18
3.1.5 Isolierung der RNA.....	19
3.1.6 DNase Verdau.....	20
3.1.7 cDNA Synthese.....	20
3.1.8 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	20
3.1.9 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	20
3.1.10 Protein-Isolation.....	24
3.1.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	24
3.1.12 Protein-Transfer auf Nitrocellulosemembran.....	25
3.1.13 Immunologische Identifizierung von Proteinen.....	25
3.2 Tierexperimentelle Methoden.....	25
3.2.1 Narkose.....	25
3.2.2 Organpräparation.....	26
3.2.3 Elektrokardiographie (EKG).....	26
3.2.4 Echokardiographie.....	27
3.2.5 Behandlung mit Kaliumcanrenoat.....	28
3.2.6 β -Adrenozeptor-Stimulation.....	29
3.2.7 Behandlung mit Aldosteron und Natriumchlorid.....	29
3.3 Immunhistochemische Methoden.....	30
3.4 Statistik.....	31
4. Ergebnisse.....	32
4.1 Etablierung der Mauslinien.....	32
4.1.1 Nachweis des Transgens im Genom.....	32
4.1.2 Nachweis der kardialen Transkription der transgenen Rezeptoren.....	33
4.1.3 Nachweis der kardialen Proteinexpression der transgenen Rezeptoren.....	33
4.1.4 Zucht der transgenen Mauslinien.....	35
4.2 Kardialer Phänotyp der hMR ^{DEF} -überexprimierenden Mäuse.....	37
4.2.1 Morphologische Parameter.....	38
4.2.2 Untersuchung der kardialen Transkription des endogenen MR.....	39

4.2.3	Untersuchung der kardialen Transkription Herzinsuffizienz-assoziiertes Gene.....	40
4.2.4	Elektrokardiographische Untersuchung.....	43
4.2.5	Echokardiographische Untersuchung.....	47
4.3	Pathologische hMR ^{DEF} -Aktivierung durch Aldosteron und Natriumchlorid.....	52
4.3.1	Morphologische Parameter bei pathologischer hMR ^{DEF} -Aktivierung.....	52
4.3.2	Kardiale Transkription bei pathologischer hMR ^{DEF} -Aktivierung.....	53
4.3.3	Elektrokardiographie bei pathologischer hMR ^{DEF} -Aktivierung.....	55
4.3.4	Echokardiographie bei pathologischer hMR ^{DEF} -Aktivierung.....	57
5.	Diskussion.....	59
5.1	Generierung der transgenen α MHC hMR ^{DEF} -Mauslinie.....	59
5.2	Kardialer Phänotyp der sechs Monate alter α MHC hMR ^{DEF} -Mäuse.....	62
5.3	Kardialer Phänotyp der zwölf Monate alter α MHC hMR ^{DEF} -Mäuse.....	70
5.4	Altersabhängige Änderung in den Herzen der α MHC hMR ^{DEF} -Mäuse.....	74
5.5	Pathologische hMR ^{DEF} -Aktivierung durch Aldosteron und Natriumchlorid.....	77
5.6	Schlussfolgerung und klinische Relevanz.....	80
	Literaturverzeichnis.....	IX
	Veröffentlichungen.....	XXIII
	Publikationen.....	XXIII
	Vorträge und Poster mit veröffentlichtem Abstract.....	XXIII
	Vorträge und Poster ohne veröffentlichten Abstract.....	XXIII
	Anhang.....	XXIV
	Puffer und Lösungen.....	XXIV
	Mineralokortikoidrezeptor-Gensequenz (NM 000901.2).....	XXVII
	Protokolle und Primer.....	XXIX
	Ergänzende Daten.....	XXXIV
	Danksagung.....	XXXIX
	Eidesstattliche Erklärung.....	XL
	Lebenslauf.....	XLI

Abkürzungsverzeichnis

Neben den Abkürzungen der deutschen Rechtschreibung laut Duden, den Internationalen Einheiten mit Präfixen und den chemischen Formeln wurden folgende Abkürzungen verwendet:

°C	Temperatur in Grad Celsius
µl	Mikroliter
αMHC	α-Isoform der schweren Kette des Myosins
Abb.	Abbildung
Aldo	Aldosteron
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
βMHC	β-Isoform der schweren Kette des Myosins
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BDM	2,3-Butanedion monoxim
bp	Basenpaar
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
BSA	bovines Serumalbumin
<i>Cacna1c</i>	Gen der alpha 1C Untereinheit (Ca _v 1.2) des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CDS	Kodierende Sequenz
cm	Zentimeter
<i>Col1a1/Col1a1</i>	Kollagen Typ 1 alpha 1/ <i>Gen für das Kollagen Typ 1 alpha 1</i>
<i>Col3a1/Col3a1</i>	Kollagen Typ 3 alpha 1/ <i>Gen für das Kollagen Typ 3 alpha 1</i>
Ct	cycle threshold
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDD	Enddiastolischer Kammerdurchmesser
ESD	Endsystolischer Kammerdurchmesser

EDV	Enddiastolisches Kammervolumen
ESV	Endsystolisches Kammervolumen
eGFP/eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein/Gen des grün fluoreszierenden Proteins (enhanced green fluorescent protein)
EF	Ejektionsfraktion
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm/Elektrokardiographie
Fn1/Fn1	Fibronektin 1/ Gen des Fibronektins 1
FS	Verkürzungsvermögen (fractional shortening = relativer Wert, der anzeigt, um wie viel Prozent der linke Ventrikel in der Systole gegenüber der Diastole kleiner wird.)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
HD _D	Hinterwanddicke des linken Ventrikels während der Diastole
HD _S	Hinterwanddicke des linken Ventrikels während der Systole
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Herzfrequenz
hMR	menschlicher Mineralokortikoidrezeptor
hMR ^{DEF}	Verkürzte Form des menschlichen Mineralokortikoidrezeptors (Enthält nur noch D-, E- und F-Domäne)
HZV	Herzzeitvolumen
i.p.	intraperitoneal
ISO	Isoprenalin, β -selektives Sympathomimetikum
<i>Kcnh2 (hERG)</i>	Gen der α Untereinheit (Kv11.1) des spannungsabhängigen, einwärtsgerichtenden Kaliumkanals (humanes <i>Ether-à-go-go</i> -Related Gen)
kDa	Kilo Dalton
K _v 7.1	α Untereinheit K _v 7.1 des spannungsabhängigen Kaliumkanals, verantwortlich für den verzögerten Kaliumauswärtsstrom
LH	Luteinisierendes Hormon
LTCC	spannungsabhängiger, langsamer (L-) Typ Ca ²⁺ -Kanal
LV	Linker Ventrikel
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute

minK	spannungsabhängiger Kaliumkanal Subfamilie E Mitglied 1 (minimal potassium subunits)
ml	Milliliter
M-Mode	zweidimensionale Ultraschallmessung (Y-Achse) in Beziehung zur Zeit (X-Achse)
MR	Mineralokortikoidrezeptor
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
ms	Millisekunde
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NO	Stickstoffmonoxid
<i>Nppa</i>	Gen des atrialen natriuretischen Peptids (ANP)
<i>Nppb</i>	Gen des natriuretischen Peptids Typ B (BNP)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P	intraatriale Erregungsausbreitung
PQ/PR	PQ/PR-Intervall (atrioventrikuläre Erregungsüberleitung)
qPCR	quantitative Real-Time PCR
QRS	intraventrikuläre Erregungsausbreitung
QT	QT-Intervall (gesamte intraventrikuläre Erregungsdauer)
QT _c	Frequenzkorrigiertes QT-Intervall nach Bazett ($QT_c = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RR	RR-Intervall
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SD _D	Septumdicke während der Diastole
SD _S	Septumdicke während der Systole
SDS	Natriumlaurylsulfat
<i>Serpina3</i>	Gen des Akut-Phase-Proteins Antichymotrypsin
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure

TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Transgen(e)
T	T-Welle des EKG
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Physiologisch reguliert der Mineralokortikoidrezeptor (MR) in epithelialen Geweben wie Niere, Darm und Speicheldrüsen die Wasser- und Elektrolythomöostase und ist somit an der Blutdruckregulation beteiligt. Daneben wird ihm eine pathophysiologische Rolle bei kardialen Umbauprozessen zugeschrieben, wodurch er die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigt. Die dabei zugrunde liegenden Pathomechanismen konnten bisher jedoch nicht endgültig aufgeklärt werden. Neben seinen gut untersuchten klassischen genomischen Effekten besitzt der MR auch einen so genannten nichtgenomischen Signalweg, der in die Pathogenese kardialer Dysfunktion involviert sein könnte.

Die vorliegende Arbeit untersucht daher die kardialen Effekte des nichtgenomischen MR-Signalwegs *in vivo* anhand eines neu generierten transgenen Mausmodells mit kardiomyozyten-spezifischer Überexpression einer trunkierten Variante des menschlichen MR ohne genomische Effekte (hMR^{DEF}).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der nichtgenomische MR-Signalweg selbst keine prohypertrophe, profibrotische oder proinflammatorische Wirkung besitzt, durch Modulation der Transkription des genomischen MR im Herzen jedoch an kardialen Umbauprozessen beteiligt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass eine pathologische Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs durch Aldosteron und Natriumchlorid die kardiale Transkription der α -Isoform der schweren Myosinkette (α MHC) reduziert, was zu einer verminderten kardialen Kontraktionsfähigkeit führen könnte. Des Weiteren ist bei pathologischer Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs die mRNA-Expression der α -Untereinheit (Kcnh2) des spannungsabhängigen Kaliumkanals hERG reduziert. Dies könnte zu einer verlängerten Repolarisation führen, die sich bei den transgenen Tieren in einer verlängerten intraventrikulären Erregungsleitung (QT_c-Intervall) äußerte und das Auftreten von Herzrhythmusstörungen begünstigen könnte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass der nichtgenomische MR-Signalweg *in vivo* bei der Pathogenese kardialer Dysfunktion eine wichtige Rolle spielt. Über die Modulation der genomischen MR-Effekte ist er zum einen am kardialen Remodeling beteiligt. Daneben beeinflusst seine pathologische Aktivierung die kardiale Kontraktilität und Erregungsleitung, wodurch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz gefördert werden könnte.

2. Einleitung

2.1 Herzinsuffizienz

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems stellen in den Industrieländern eine der häufigsten Todesursachen dar (WHO 2015). In Deutschland wurden im Jahr 2013 etwa 40% der Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursacht, wobei ca. 13% dieser Sterbefälle auf eine vorliegende Herzinsuffizienz zurückzuführen waren (Statistisches Bundesamt 2015). Mit mehr als zehn Millionen betroffener Patienten ist die Herzinsuffizienz eine der behandlungsintensivsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Europa und mit einer jährlichen Inzidenz von 250.000 einer der häufigsten Gründe für eine stationäre Krankenhausaufnahme in Deutschland (Fink und Haidinger 2000, Neumann et al. 2009). Im Hinblick auf die alternde Bevölkerung ist im Laufe der nächsten Jahre außerdem mit einem deutlichen Anstieg der Neuerkrankungen zu rechnen.

Unter der Herzinsuffizienz versteht man eine progressive Funktionsstörung, die durch ein initiales Ereignis, wie z.B. die Zerstörung von Herzmuskelzellen beim Myokardinfarkt, hervorgerufen wird und mit der Abnahme der kardialen Pumpfunktion einhergeht (Bonow et al. 2012). Hierbei handelt es sich jedoch nicht um eine eigenständige Erkrankung, sondern vielmehr um ein klinisches Syndrom mit einem kardial bedingten, in Ruhe und/oder unter Belastung verminderten Herzminutenvolumen, wodurch die Organe unzureichend mit Blut versorgt werden und es zum Sauerstoffmangel kommen kann (McMurray et al. 2012). Die kardialen Dysfunktion kann dabei durch einen systolischen (verminderte Pumpleistung) oder einen diastolischen (verminderte Ventrikelfüllung) Funktionsverlust hervorgerufen werden bzw. aus einer Mischform dieser beiden bestehen (McMurray et al. 2012, Hunt et al. 2009, Paulus et al. 2007). Ein systolischer Funktionsverlust ist durch eine verminderte linksventrikuläre Auswurfleistung (Ejektionsfraktion $< 50\%$) sowie einem erhöhten enddiastolischen Druck und enddiastolischen Volumen gekennzeichnet (Jessup and Brozena 2003, McMurray et al. 2012) und tritt u.a. bei einer verminderten kardialen Kontraktilität, z.B. nach einem Herzinfarkt, oder einer erhöhten Nachlast auf (Chavey et al. 2001, Koelling et al. 2002). Beim diastolischen Funktionsverlust dagegen ist die systolische Auswurfleistung unverändert, die Dehnbarkeit (Compliance), vor allem des linken Ventrikels, jedoch vermindert (Aurigemma and Gaasch 2004). Ursache hierfür kann u.a. eine geringere Entspannung (Relaxation) z.B. aufgrund von Durchblutungsstörungen (Ischämie), Wanddickenzunahme (Hypertrophie bei Bluthochdruck) bzw. Alterungsprozessen oder eine verminderte passive Füllung z.B. durch Vernarbung des Gewebes nach einem Herzinfarkt oder einer restriktiven Kardiomyopathie sein (Aurigemma and Gaasch 2004).

Den ventrikulären Funktionsstörungen können zahlreiche weitere angeborene oder erworbene Grunderkrankungen zugrunde liegen. Zu erwähnen sind hier vor allem die

arterielle Hypertonie, koronare Herzerkrankungen und der Diabetes mellitus sowie die mit mechanischen und/oder elektrophysiologischen Störungen assoziierten Kardiomyopathien (Levy et al. 1996).

Bei einer chronisch reduzierten kardialen Pumpleistung kommt es schließlich zur bereits erwähnten Minderperfusion der Organe, wodurch ein Sauerstoffmangel (Hypoxie) entsteht und die Organfunktion eingeschränkt wird. In der Folge kann es dann zum Multiorganversagen kommen (Swedberg et al. 2005).

Klinisch ist die Herzinsuffizienz durch typische Symptome wie z.B. Dyspnoe, schnelle Ermüdbarkeit (Leistungsminderung) und/oder Flüssigkeitsretention bis hin zur Ödembildung gekennzeichnet, mit deren Hilfe der Schweregrad der Erkrankung festgestellt werden kann (McMurray et al. 2012). Abhängig von der körperlichen Belastbarkeit des Patienten erfolgt international eine Klassifikation des Schweregrads, z.B. nach Kriterien der New York Heart Association (NYHA), in vier klinische Stadien (Hasenfuß et al. 2013).

Bedingt durch die verminderte ventrikuläre Funktion kommt es schließlich im Herzen neben der Hypoxie zu einer erhöhten kardialen Wandspannung und einer gesteigerten Aktivität der Barorezeptoren, wodurch zahlreiche Mechanismen aktiviert werden, welche die Myokardfunktion stabilisieren und somit die Versorgung lebenswichtiger Organe sicherstellen sollen (Louridas and Lourida 2012). Langfristig haben diese „Kompensationsmechanismen“ jedoch pathologische Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System, wodurch die kardiale Funktion weiter abnimmt (Dube and Weber 2011). Es entsteht ein Teufelskreis (Abb. 1).

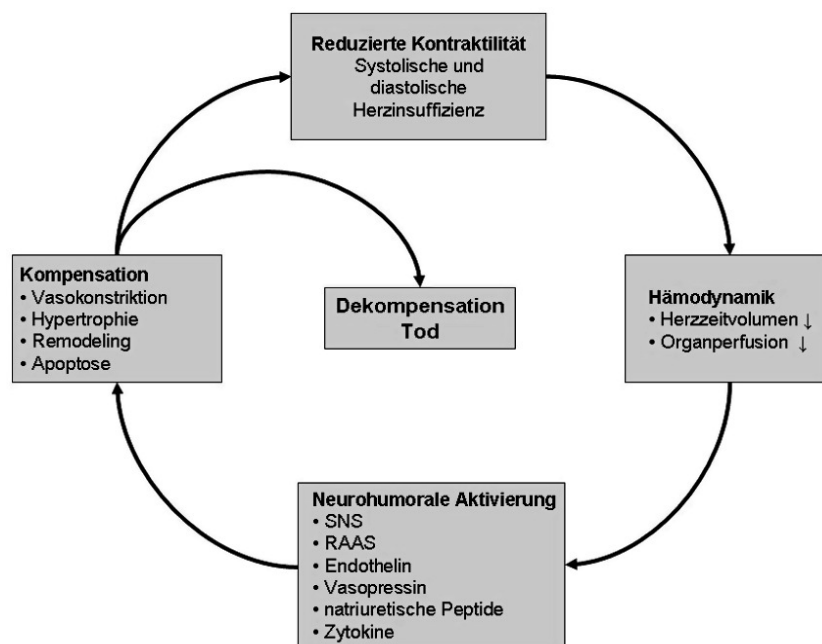


Abb. 1: Teufelskreis einer chronischen Herzinsuffizienz (nach Weil und Schunkert 2006).
(SNS = sympathisches Nervensystem; RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System).

Dauerhaft aktiviert führen die Kompensationsmechanismen, die eigentlich der Homöostase dienen sollen, zu strukturelle und molekulare Veränderungen im Herzen wie z.B. Myokardhypertrophie, Fibrosierung, gesteigerte Apoptose, Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Tachykardie (Jane-Lise et al. 2000, Kostin et al. 2000, Narula et al. 1996). Diese kardialen Umbauprozesse werden als „Remodeling“ bezeichnet und gehen mit der Pathogenese einer Herzinsuffizienz einher (Pitt et al. 1999, 2003). So kommt es u.a. bei einer klinisch manifestierten Herzinsuffizienz durch eine anhaltende adrenerge Stimulation (Kaye et al. 1995) zur Reduktion der kardialen β_1 -Adrenozeptordichte, wodurch die positiv inotrope Wirkung von β -Adrenozeptoragonisten abnimmt. (Colucci 1990).

Um die Durchblutung in den Organen aufrecht zu halten, kommt es außerdem zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Weil und Schunkert 2006). Dabei wird bei einer Myokardhypertrophie das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) im Herzen verstärkt exprimiert und somit ist die lokale Synthese des Gewebehormons Angiotensin II (Ang II) bereits drastisch erhöht lange bevor im zirkulierenden Blut eine erhöhte Renin-Konzentration messbar ist (Morishita et al. 1994). Dies führt lokal im Herzen zu Gefäßverengungen, wodurch Endothelschäden entstehen können (Unger and Li 2004). Zusätzlich kommt es durch Ang II zu einer verminderten Relaxation der Herzkammern. Bei einer bereits vorhandenen kardialen Schädigung, z.B. nach einem Herzinfarkt oder bei Herzhypertrophie, führt sich dies zu einem verminderten Schlagvolumen, wodurch die Perfusion der Organe weiter abnimmt und somit vor allem eine kardiale Hypoxie begünstigt wird (Weil und Schunkert 2006).

Die Konzentration des Nebennierenrindenhormons Aldosteron (Aldo) im Plasma steigt bei einer Herzinsuffizienz ebenfalls lokal im Herzen an, wodurch es aldosteronabhängig zu einer Zunahme von Fibrozyten kommt und die kardiale Fibrosierung gefördert wird (Unger and Li 2004).

Ziel der Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz ist es daher den Teufelskreis zu durchbrechen und den Organismus vor einer Entgleisung seiner Kompensationsmechanismen zu schützen. Abhängig vom Schweregrad der Herzinsuffizienz werden dabei unterschiedliche Wirkstoffe kombiniert (McMurray et al. 2012). Die Standardtherapie umfasst dabei neben β -Adrenozeptor-Blocker auch Diuretika und Herzglykoside, die die Herzarbeit ökonomisieren und das Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot ausgleichen sollen (Cohn 1996, Gottlieb et al. 1998, Hoppe et al. 2005, Packer et al. 2001). Zur Senkung der Progredienz einer Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion sind außerdem ACE-Hemmer ab NYHA Klasse I indiziert (Hasenfuß et al. 2013).

Klinische Studien (RALES, EPHEBUS) stellten ferner den Vorteil einer Kombination der Standardtherapie mit einem Aldosteron-Antagonisten fest (Pitt et al. 1999, 2003). Das Risiko

kardiovaskulärer Mortalität und Morbidität bei vorliegender Herzinsuffizienz mit eingeschränkter Auswurfleistung konnte dabei deutlich verringert und pathophysiologische Merkmale wie kardiales Remodeling und Hypertrophie verhindert werden (Pitt et al. 1999, 2003). Daher sind Mineralokortikoidrezeptor (MR)-Inhibitoren seit 2012 generell ab NYHA Klasse II zur Therapie der Herzinsuffizienz bei verminderter Ejektionsfraktion (systolische Dysfunktion) empfohlen (Hasenfuß et al. 2013). Ein Nutzen der MR-Inhibitoren bei Herzinsuffizienz mit isolierter diastolischer Dysfunktion konnte dabei durch neuere Studien nicht belegt werden (Pfeffer et al. 2015 (TOPCAT Trial)).

Diese Ergebnisse legen somit die Vermutung nahe, dass der MR an der Pathogenese der systolischen Herzinsuffizienz beteiligt ist.

2.2 Physiologie und Pathophysiologie des Mineralokortikoidrezeptors (MR)

Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) gehört zur Klasse der Steroidhormon-Rezeptoren und ist ein Mitglied der Nuklearrezeptor Superfamilie (Unterfamilie 3 (Östrogen-rezeptorartige), Gruppe C, Mitglied 2 (NR3C2)) (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999). Die erste cDNA Klonierung des menschlichen MR (hMR) gelang 1987 (Arriza et al. 1987), der zahlreiche Charakterisierungen des MR in verschiedenen Spezies folgten (Greenwood et al. 2003, Hodgson et al. 2007, Patel et al. 1989, Patel et al. 2000, Porter et al. 2007, Pryce et al. 2005, Sturm et al. 2005).

Wie alle Mitglieder der Steroid-Rezeptorfamilie ist der menschliche MR aus vier Protein-Domänen aufgebaut und besteht insgesamt aus 984 Aminosäuren (Kumar and Thompson 1999). Die A/B-Domäne stellt dabei die Koaktivator-Bindestelle dar (N-terminal), über die C-Domäne bindet der aktivierte MR an die DNA, die D-Domäne fungiert als Scharnierregion und C-terminal bindet der Ligand an die E/F-Domäne (Abb. 2).

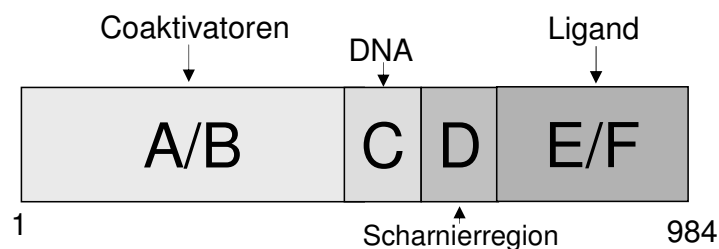


Abb. 2: Schematische Darstellung des MR mit den einzelnen Protein-Domänen (nach Seiferth 2013).

A/B	Koaktivator-Bindestelle
C	Bindedomäne für die DNA
D	Scharnierregion
E/F	Ligandenbindedomäne

Bei dem MR handelt es sich somit um einen Liganden-abhängigen Transkriptionsfaktor (Porter et al. 1964), der u.a. in epithelialen Geweben wie Niere, Darm und Speicheldrüsen exprimiert wird. Klassischerweise ist er durch Modulation der Na^+/K^+ -Homöostase und des Wasserhaushaltes langfristig an der Blutdruckregulation beteiligt (Grossmann et al. 2008, Grossmann and Gekle 2009).

Im inaktiven Zustand befindet sich der MR im Zytosol, wo er Komplexe u.a. mit dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) (Binart et al. 1995) und Calcineurin (Seiferth et al. 2012) bildet. Durch Bindung seines endogenen Liganden, des aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde (NNR) stammenden Mineralokortikoids Aldosteron (Aldo), erfolgt eine Translokation des aktivierten MR in den Zellkern. Hier bindet er als Homodimer, ohne seine Komplexproteine, über das Glukokortikoid-responsive Element (GRE) an die DNA und moduliert somit die Transkription spezifischer Zielgene (Grossmann et al. 2008).

Gene, die durch MR-Aktivierung beeinflusst werden, kodieren u.a. für den apikalen epithelialen Natriumkanal (ENaC, über aldosteronvermittelte Expressionsänderung der Serum-Glukokortikoid-regulierten Kinase 1 (Sgk1)), die basolaterale Natrium/Kalium (Na^+/K^+)-ATPase und spezielle K^+ -Kanäle (ROMK) im Tubulussystem der Niere, die an der Elektrolyt- und Volumenregulation beteiligt sind (Beesley et al. 1998, Bhargava et al. 2001; Chen et al. 1999, Horisberger et al. 1991, Kolla and Litwack 2000). Die Regulation des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) durch Aldo dient im Regelkreis der aldosteronabhängigen Na^+ -Retention als negativer Feedbackmechanismus (Grossmann et al. 2004, Krug et al. 2003).

Gesteuert werden die Synthese und Sekretion von Aldo vor allem durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Fällt der renalen Blutdruck akut unter 90 mmHg, so wird aus dem juxtaglomeruläre Apparat die spezifische Endopeptidase Renin ins Blut sezerniert. Renin spaltet das in der Leber synthetisierte Plasmaprotein Angiotensinogen proteolytisch zum Angiotensin I (Ang I) (Pacurari et al. 2014). Aus Ang I entsteht durch erneute enzymatische Spaltung durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) das

blutdruckregulatorisch wirksame Gewebeshormon Ang II, welches die Synthese und Sekretion von Aldo in der Nebennierenrinde gesteigert. Weitere Stimuli für die Aldosteronfreisetzung stellen u.a. Hyponatriämie und Dehydrierung dar (Williams and Dluhy 1972).

Neben Aldosteron kann auch das ebenfalls in der NNR synthetisierte Steroidhormon Kortisol (Kortikosteron bei Nagern) an den MR binden (Arriza et al. 1987, Krozowski and Funder 1983). Die frei im Blut zirkulierende Kortisol-Konzentration ist physiologisch etwa 100-fach höher als die Aldosteron-Plasmakonzentration, wodurch theoretisch die Gefahr einer permanenten MR-Aktivierung durch Glukokortikoide besteht (Funder 2010, 2012). Durch die Koexpression des MR mit der 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 β -HSD2) in den aldosteronsensitiven Zellen von Niere, Darm und Drüsen wird jedoch eine kortisolabhängige Daueraktivierung des MR verhindert (Edwards et al. 1988 Funder et al. 1988). Die 11 β -HSD2 setzt dabei Kortisol enzymatisch zu Kortison (bzw. Kortikosteron zu 11 Desoxykortikosteron bei Nagern) um, welches keine Affinität zum MR besitzt und somit unter physiologischen Bedingungen keine Aktivierung des MR durch Glukokortikoide stattfindet (Alzamora et al. 2000). Ist jedoch der intrazelluläre Redox-Zustand z.B. als Folge eines Traumas verändert, so kann die Aktivität der 11 β -HSD2 verändert sein und eine MR-Aktivierung durch Glukokortikoide, ähnlich wie bei einem erhöhten Kortisol-Plasmaspiegel, erfolgen (Funder 2009, Mihailidou et al. 2009, Ward et al. 2001).

Außerhalb der epithelialen Organe wie Niere, Darm und Speicheldrüse (Grossmann and Gekle 2009) konnte der MR in zahlreichen weiteren Geweben nachgewiesen (Fuller and Young 2005, Fuller et al. 2012) werden. Hierbei wurde vor allem seine Rolle in der Pathogenese der spezifischen Gewebeerkrankungen untersucht. So ist z.B. die MR-Aktivität bei einer Adipositas deutlich erhöht (Caprio et al. 2007, Caprio et al. 2011). Auch bei Erkrankungen der Haut (Farman et al. 2010), der Augen (Touyz and Callera 2009, Zhao et al. 2010) und des zentralen Nervensystems (Gomez-Sanchez 2011, Krozowski and Funder 1983) spielt eine gesteigerte MR-Aktivität eine wichtige Rolle. Daneben zeigt sich eine MR-abhängige Modulation des Immunsystems (Rickard et al. 2009, Usher et al. 2010), wobei eine MR-Stimulation die Expression zahlreicher proinflammatorischer Faktoren, u.a. den transformierenden Wachstumsfaktors β (TGF- β) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) (Marney and Brown 2007), steigert. Weitere wichtige Entzündungs- und Proliferationsmodulatoren, wie der *placental growth factor* (PGF) und *connective tissue growth factor* (CTGF), wurden in den Gefäßen ebenfalls als aldosteroninduziert identifiziert (Jaffe et al. 2010, Newfell et al. 2011). Durch Aktivierung von NADPH-Oxidasen (NOX) steigt die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) an, wodurch Aldosteron weitere

Entzündungsprozesse unterhält (Johar et al. 2006, Sun et al. 2002). Begünstigt wird durch eine MR-Stimulation ebenfalls die Ang II-vermittelte NOX-Aktivierung im Herzen und der Aorta (Stas et al. 2007, Virdis et al. 2002).

Die Beteiligung von Aldosteron bzw. seines Rezeptors an pathophysiologischen Prozessen im renokardiovaskulären System (Grossmann und Gekle 2009) wird außerdem durch eine aldosteronabhängige renale Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI1) verdeutlicht (Yuan et al. 2007). Daneben kommt es durch Aldosteron zu apoptotischen Prozessen in renalen Mesangiozyten (Mathew et al. 2008). In Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen konnte der MR ebenfalls lokalisiert (Lombès et al. 1992, Hernández-Díaz et al. 2010, Nguyen Dinh Cat et al. 2010, Nguyen Dinh Cat et al. 2011, Pearce and Funder 1987) sowie eine MR-abhängige Regulation des Gefäßmuskeltonus und des Blutdrucks nachgewiesen werden (Nguyen Dinh Cat et al. 2010).

Im Tiermodell führt eine erhöhte Aldosteron-Serumkonzentration im Herzen zu Fibrosebildung, endothelialer Dysfunktion, Hypertrophie und strukturellen Veränderungen, wodurch sich, aldosteroninduziert, atriale Arrhythmien entwickeln können (Blasi et al. 2003, Brilla and Weber 1992, Qin et al. 2003, Reil et al. 2012, Rocha et al. 2002, Young and Funder 2003). Spironolacton, ein MR-Inhibitor, verhindert dagegen eine aldosteronabhängige atriale Fibrosierung und Apoptose in Myokardinfarkt-Modellen (Miliez et al. Sept 2005).

In isolierten Kardiomyozyten moduliert eine MR-Aktivierung daneben die kardialen Ionenströme, wobei der auswärts gerichtete K^+ -Strom (I_{to1}) aldosteronabhängig vermindert sein kann, der Ca^{2+} -Strom bzw. die Expression des transienten Calciumkanals (T-Typ Ca^{2+} -Kanal) und des langsamen (long-lasting) Ca^{2+} -Kanals (L-Typ, LTCC) dagegen ansteigt (Bénitah et al. 2001, Lalevée et al. 2005, Perrier et al. 2005), wodurch Arrhythmien ebenfalls begünstigt werden (Nguyen Dinh Cat and Jaisser 2012).

Klinische Studien konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Aldosteron-Plasmakonzentration und einer erhöhten Mortalität bei bestehender Herzinsuffizienz oder einer Hypertrophie des linken Ventrikels (Rossi et al. 1997, Swedberg et al. 1990) aufzeigen. Daneben wurde eine aldosteroninduzierte kardiale Fibrose unabhängig vom blutdruckregulierenden Effekt des Aldosterons belegt (Brilla et al. 1993).

In den klinischen Studien RALES und EPHEsus zeigten Pitt und seine Mitarbeiter zwar, wie bereits erwähnt, den Vorteil von Aldosteron-Antagonisten in der Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz auf, sie konnten jedoch keine erhöhten Aldosteron-Plasmakonzentrationen bei den Patienten feststellen (Pitt et al. 1999, 2003).

Somit bestärken sowohl experimentelle als auch klinische Studien die Hypothese, dass Aldosteron und/oder der MR an pathophysiologischen Prozessen kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sein könnten, die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt. Abbildung 3 fasst schematisch die wichtigsten bisher bekannten physiologischen und pathophysiologischen Effekte des MR im renokardiovaskulären System zusammen.

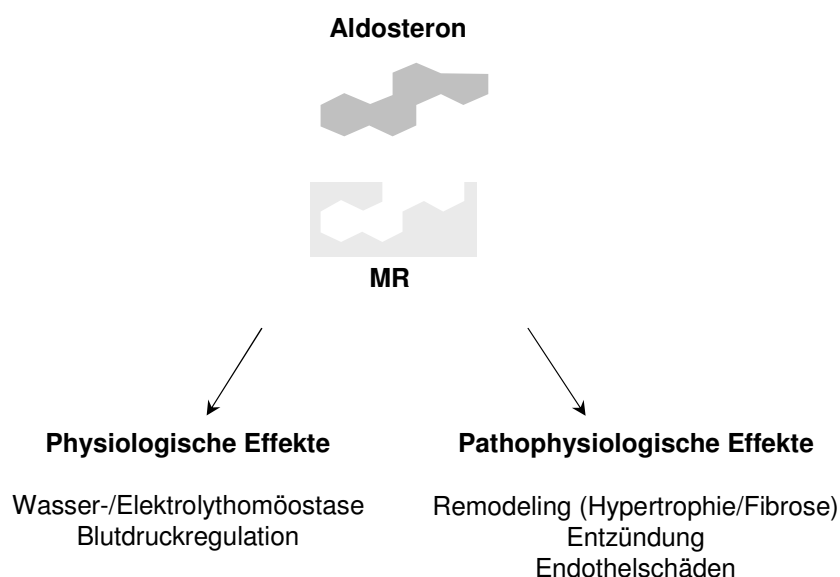


Abb. 3: Schematische Darstellung der physiologischen und pathophysiologischen MR-vermittelten Effekte im renokardiovaskulären System (modifiziert nach Grossmann und Gekle 2012).

Als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor bindet der MR über das Glukokortikoid-responsive Element (GRE) an die DNA und vermittelt so seine klassische Wirkung (genomischer Signalweg), die, abhängig von Transkription und Translation, z.T. erst Stunden nach MR-Aktivierung messbar ist (Grossmann und Gekle 2009). Daneben zeigen sich aldosteroninduzierte zytosolische Effekte, die deutlich schneller auftreten, unempfindlich gegenüber Transkriptions- oder Translationsinhibitoren sind und daher als „nichtgenomisch“ bezeichnet werden (Moura and Worcel 1984). Die Aktivität des nichtgenomischen Signalwegs konnte u.a. in Niere, Darm, glatten Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten sowie am isolierten Herzen beobachtet werden (Barbato et al. 2002, Christ et al. 1995, Ganong and Mulrow 1958, Maguire et al. 1995, Sato et al. 1997).

Über den nichtgenomischen Signalweg kommt es u.a. zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Mihailidou et al. 2004), wodurch die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt und der Na^+/H^+ -Austauscher (NHE) aldosteroninduziert aktiviert wird (Harvey et al. 2002, Gekle et al. 1995, 2001). Es kommt zum Anstieg des intrazellulären pH-Wertes und einer Änderung der Na^+ -Konzentration, die ihrerseits das Zellvolumen und die Aktivität pH-

sensitiver K⁺-Kanäle beeinflussen (Grossmann und Gekle 2009). Des Weiteren konnten nichtgenomische proarteriosklerotische Effekte (Krug et al. 2007) und proinflammatorische MR- bzw. aldosteronabhängig beobachtet werden (Krug et al. 2010).

Ein Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch schnelle, aldosteroninduzierte NADPH Oxidase-Aktivierung, vermittelt über *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2* (ERK1/2)-Phosphorylierung und PKC Aktivität (Miyata et al. 2005a, Miyata et al. 2005b), führt in Kardiomyozyten zu apoptotischen Prozessen (Hayashi et al. 2008). Durch Aktivierung der Matrix-Metalloproteasen (MMP) 2 und 9 werden außerdem kardiale Umbauprozesse begünstigt (Rude et al. 2005).

Aldosteroninduzierte NADPH Oxidase-Aktivierung, Inhibierung der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und gesteigerte Aktivität der NO-Synthase (mit Anstieg der Superoxid-Konzentration in Endothelzellen) haben außerdem oxidative Gewebeschäden und Vasokonstriktion zur Folge (Skøtt et al. 2006).

Über die Aktivierung zytosolischer Signalkaskaden durch den nichtgenomischen Aldo/MR-Signalweg kann es sekundär zu Änderungen in der Transkription kommen. Diese Veränderungen können GRE-unabhängig über eine Interaktion mit der zytosolischen Phosphatase Calcineurin und dem CREB/cAMP-Signalweg vermittelt sein und u.a. proinflammatorische Gene regulieren (Grossmann et al. June 2010, Seiferth et al. 2012).

Eine MR-abhängige Transaktivierung des membranständigen EGFR (Grossmann et al. 2005, Grossmann and Gekle 2008, Grossmann et al. May 2010) führt über den ras/raf-Signalweg zu einer Aktivierung der *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Kaskade. Die anschließende Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren steigert u.a. die Transkription von Wachstumsfaktoren und begünstigt somit proliferative Prozesse (Pearson et al. 2001).

Durch Interaktion des nichtgenomischen MR-Signalwegs mit dem genomischen MR-Signalweg sind jedoch auch GRE-abhängige Effekte möglich (Mihailidou et al. 2004, Pfau et al. 2007). So kommt es zu einer Steigerung der klassischen genomischen MR-Effekte durch die nichtgenomisch vermittelte MR-abhängige ERK-Phosphorylierung, welche zu einer verstärkten Translokation des MR in den Zellkern führt (Grossmann et al. 2005).

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass der nichtgenomische Aldo/MR-Signalweg an zahlreichen Prozessen der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, z.B. kardialen Entzündungs- oder Umbauprozessen, beteiligt ist.

Um festzustellen, welche Domänen für den nichtgenomischen Aldo/MR-Signalweg essentiell sind, untersuchten Grossmann et al. 2008 trunkierte Formen des MR *in vitro* und konnten zeigen, dass für die nichtgenomische Aktivität, wie bereits für andere Mitglieder der Nuklearrezeptor-Superfamilie beschrieben (Barletta et al. 2004, Boonyaratankornkit et

al. 2001, Chambliss et al. 2005, Kumar and Thompson 1999, Pfau et al. 2007), die E/F-Domäne verantwortlich ist (Grossmann et al. 2008). Die nichtgenomischen Effekte des MR werden also über die Ligandenbindedomäne (LBD, E/F-Domäne) vermittelt. Daher war dieser Teil des Proteins für die Untersuchung der kardialen nichtgenomischen Effekte des MR im transgenen Mausmodell von besonderem Interesse.

In Abbildung 4 sind schematisch die möglichen Wege der MR-vermittelten genomischen und nichtgenomischen Signalkaskaden von Aldosteron dargestellt.

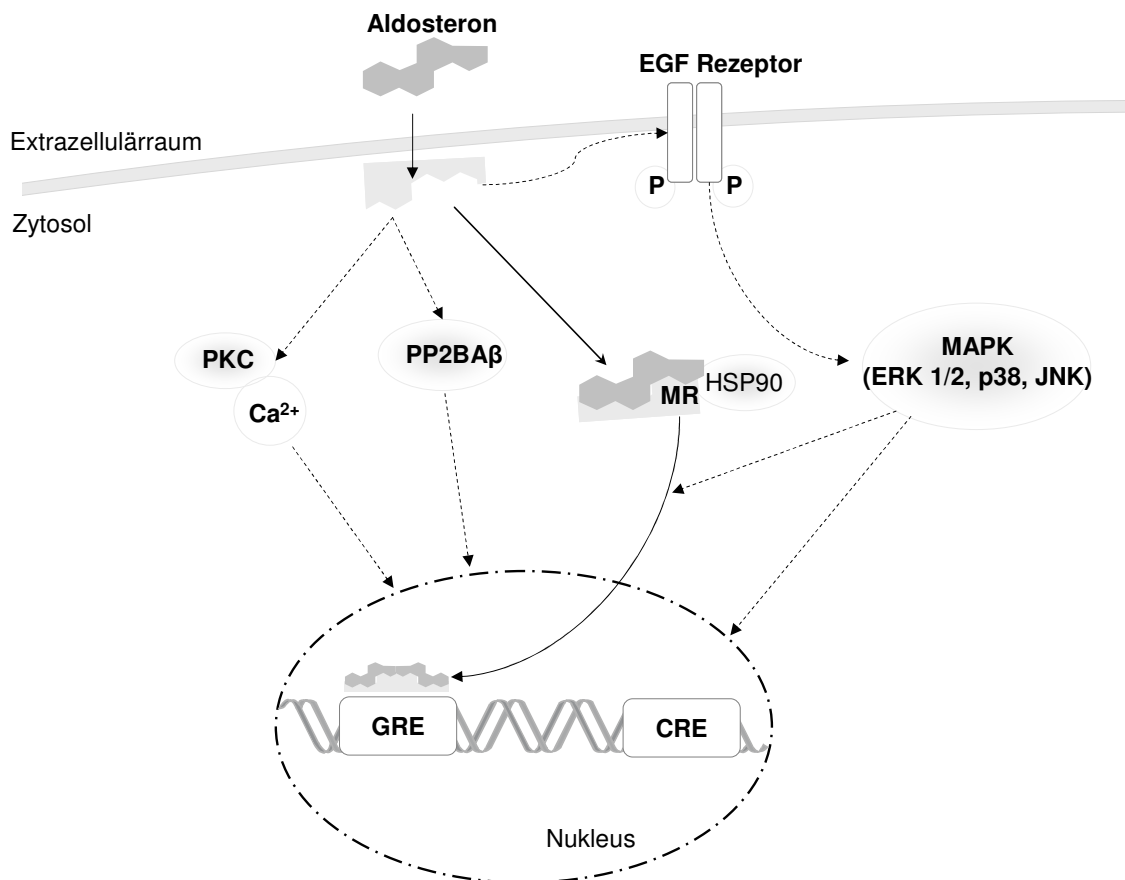


Abb. 4: Schematische Darstellung der MR-vermittelten genomischen und nichtgenomischen Signalkaskaden von Aldosteron (modifiziert nach Grossmann und Gekle 2012).

2.3 Mausmodelle mit veränderter MR-Expression

Ein besseres Verständnis der physiologischen und besonders der pathophysiologischen Effekte des MR *in vivo* konnte durch zahlreiche Tiermodelle mit veränderter Expression des MR erreicht werden.

Bereits 1998 konnten Berger et al. zeigen, dass Mäuse, bei denen eine globale Inaktivierung der DNA-Bindedomäne des MR erfolgte, während der ersten postnatalen Woche Symptome von Pseudohyperaldosteronismus aufwiesen. Etwa 10 Tage nach der Geburt starben diese Mäuse an Dehydrierung, verursacht durch massiven renalen Natrium- und Flüssigkeitsverlust. Die Gabe von Natriumchlorid konnte die Letalität bei homozygoten Jungtieren jedoch verhindern (Berger et al. 2000).

Ein kardiomyozyten-spezifisch induzierbarer Knockdown des endogenen MR *in vivo* konnte mittels Antisense-mRNA, deren Expression unter der Kontrolle des Promotors der schweren Kette des Myosins (α *myosin heavy chain* (α MHC)) stand, erreicht werden (Beggah et al. 2002). Dieses transgene Mausmodell entwickelte innerhalb von drei Monaten eine Herzinsuffizienz und kardiale Fibrose, allerdings ohne Bluthochdruck oder chronischen Hyperaldosteronismus aufzuweisen. Die kardialen Veränderungen waren durch Abschalten der Antisense-mRNA reversibel (Beggah et al. 2002).

Die Eliminierung des MR spezifisch in murinen Kardiomyozyten *in vivo* unter der Kontrolle des Promotors der leichten Kette des Myosins (*myosin light chain* (MLC2a)), zeigte im Herzinfarktmodell eine verbesserte post-ischämische Heilung sowie vermindertes kardiales Remodeling (Fraccarollo et al. 2011). Dieser kardiomyozyten-spezifische Knockout verhinderte außerdem eine kardiale Hypertrophie im chronischen Herzinfarktmodell (Lother et al. 2011).

Spezifisches Ausschalten des MR in Fibroblasten unter der Kontrolle des Kollagen 1 α 2 (*collagen 1 α 2* (COLCre)) Promotors schützte dagegen nicht vor einer Vergrößerung des Herzens oder Funktionsverlust bei chronisch erhöhter Nachlast (Lother et al. 2011), was bedeutet, dass die MR-Wirkung nicht auf die Fibroblasten begrenzt zu sein scheint.

Ein Aktivitätsverlust des MR in Makrophagen schützt dabei vor Ang II-induzierter kardialer Hypertrophie und Fibrosebildung sowie vor Gefäßschäden (Usher et al. 2010).

Neben den Modellen mit einem MR-Defizit wurden auch Mäuse mit einer MR-Überexpression etabliert.

Bei gleichzeitiger Überexpression des MR in Hirn, Niere und Herz zeigten transgene Tiere vergrößerte Nieren mit einem erweiterten Tubulussystem, einhergehend mit einer verminderten renalen Kaliumausscheidung. Es war außerdem eine milde Kardiomyopathie mit vergrößertem linksventrikulären Durchmesser und vermindertem Verkürzungsvermögen bei normalem Blutdruck aber erhöhter Herzfrequenz zu beobachten (Le Menuet et al. 2001). Untersuchungen der Transkription deckten Veränderungen sowohl bei kardial- als auch renal-spezifischen Genen, u.a. der Na⁺/K⁺-ATPase und des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), auf. Eine erhöhte Sterblichkeit dieser Mäuse wurde hier jedoch nicht beobachtet (Le Menuet et al. 2001).

Im Tiermodell mit induzierbarer herzspezifischer MR-Überexpression unter der Kontrolle der kardialen α -Isoform der schweren Kette des Myosins (α MHC Promotor) war dagegen eine erhöhte Inzidenz von Arrhythmien zu beobachten (Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Gekoppelt an ein Tetrazyklin-induzierbares (Tet-off) System konnte die Expression des MR durch Gabe des Tetrazyklin-Analogons Doxycyclin im Herzen reguliert werden. Bei Aktivierung des MR zeigten die Mäuse, sowohl eine erhöhte intrauterine Sterblichkeit aufgrund schwerer Arrhythmien als auch eine gesteigerte postnatale Letalität (Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Diese Funktionsstörungen waren dabei auf elektrophysiologische Veränderungen im Herzen zurückzuführen. So war in den transgenen Kardiomyozyten der auswärtsgerichtete transiente K^+ -Strom (I_{to}) vermindert (Verlängerung der Aktionspotenzialdauer), der L-Typ Ca^{2+} -Strom (I_{Ca}) hingegen vergrößert. Interessanterweise entwickelte keines dieser MR-überexprimierenden Mausmodelle die erwartete kardiale Fibrose (Nguyen Dinh Cat and Jaisser 2012, Ouvrard-Pascaud et al. 2005), wie es in Studien mit einseitig nephrektomierten und Aldosteron/Salz-behandelten Mäusen beschrieben wurde (Young et al. 1994).

Die unterschiedlichen Tiermodelle demonstrieren eine breit gefächerte, sowohl physiologische als auch pathophysiologische Rolle des MR im Herzen, die bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

Mit den bisher etablierten Mausmodellen zur veränderten MR-Aktivität ist es jedoch nicht möglich, die nichtgenomischen Effekten isoliert zu untersuchen.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Die großen klinischen Studien RALES und EPHEsus (Pitt et al. 1999, 2003) zeigen deutlich den Nutzen einer MR-Antagonisierung im Rahmen der systolischen Herzinsuffizienz-Therapie auf (Reduktion von Mortalität und Morbidität). Vermutlich wird dabei sowohl eine Veränderung der kardialen Erregungsleitung verhindert als auch Umbauprozesse (Remodeling) im Herzen gehemmt, welche durch proinflammatorische und profibrotische Prozesse verursacht werden.

Da bisher nicht eindeutig geklärt ist, über welchen Signalweg der MR die Pathogenese einer kardiovaskulärer Erkrankung, respektive einer Herzinsuffizienz, beeinflusst, sollte in der vorliegenden Arbeit anhand von Mausmodellen der genomische und der nichtgenomische Signalweg im Herzen *in vivo* getrennt von einander untersucht werden.

Hierfür wurde ein transgenes Mausmodell etabliert, dass spezifisch in den Kardiomyozyten eine trunkeerte Form des MR überexprimiert, welche nur die für die nichtgenomischen Effekte relevante Domänen (D-, E- und F-Domäne) enthielt. Somit stand zum ersten Mal ein Modell zur Verfügung, welches die Beurteilung der Rolle des nichtgenomischen Signalwegs bei der

Entstehung und Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen zuließ. Als Vergleichsmodell diente eine weitere transgene Mauslinie, die den kompletten MR (beinhaltete die Domänen A bis E) spezifisch im Herzen überexprimierte.

Im Hinblick auf die pathophysiologische Rolle des nichtgenomischen MR-Signalwegs folgte auf die Etablierung der Mauslinien eine umfassende kardiale Charakterisierung der Mausmodelle, die sowohl biochemische als auch funktionelle Aspekte umfasste. Ergänzend wurde der Effekt einer pathologischen Aktivierung durch ein unphysiologisches Aldosteron/Natriumchlorid-Verhältnis auf die kardiale Transkription bzw. Funktion untersucht.

3. Material und Methoden

Alle verwendeten Puffer und Lösungen sowie Protokolle und Primer sind im Anhang aufgeführt.

3.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.1.1 Herstellung der Plasmide

Zur Herstellung der Plasmide wurde der humane Mineralokortikoidrezeptor (hMR) (NM 000901.2) verwendet, dessen Proteinsequenz zu 97,5 % mit der murinen Sequenz übereinstimmt (Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Ausgehend vom peGFP-C1-hMR Vektor, der den hMR gekoppelt an das Gen des grün fluoreszierenden Proteins (*enhanced green fluorescent protein, eGFP*) bereits enthielt (Ouvrard-Pascaud et al. 2004), wurde die für die trunkierte DEF-Form (hMR^{DEF}) kodierende DNA Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) generiert.

Mit Hilfe der in Tabelle 13 (siehe Anhang) angegebenen Primer wurden Amplifikate mit Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung gewonnen. Auf die PCR folgte die Ligation des Produktes in den pCR[®]2.1 Vektor von Invitrogen mittels TA Cloning KIT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit anschließender Transformation in *E.coli* XU-Blue. Nach anschließender Amplifikation wurde das pCR[®]2.1-hMR^{DEF} Plasmid isoliert.

Durch Klonierung in den eGFP-C1 Vektor (Takara Bio Europe/Clontech Saint-Germain-en-Laye Frankreich) wurde hMR^{DEF} an eGFP gekoppelt. Der erste Schritt war ein Restriktionsverdau beider Vektoren durch die Restriktionsenzyme Bgl II und Hind III (New England Biolabs, Ipswich, Großbritannien) mit anschließender Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel und Extraktion der Restriktionsprodukte (eGFP-C1 Fragment: 4700 bp, hMR^{DEF} Fragment: 921 bp). Die Ligation der Fragmente erfolgte mit dem TA Cloning KIT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Für die Verifizierung der erfolgreichen Klonierung erfolgte im Anschluss an Transformation und Plasmidpräparation ein erneuter Verdau des peGFP-hMR^{DEF} Vektors mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Hind III. Die Größe des Fragments (750 bp) wurde mittels Gelelektrophorese in einem 1,5% Agarosegel überprüft.

Anschließend wurde eGFP-hMR bzw. eGFP-hMR^{DEF} mittels erneuter Klonierung an den herzspezifischen α -myosin heavy chain Promotor (α MHC) gekoppelt. Die Restriktion des peGFP-C1-hMR Vektors (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. Nicolette Farman, Paris, Frankreich) sowie des peGFP-C1-hMR^{DEF} Vektors erfolgte durch die Restriktionsenzyme Age I und Sal I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Zur

Unterscheidung von gesuchtem Fragment und Restvektor in der Gelelektrophorese wurde der Restvektor zusätzlich mit Sfi I geschnitten. Parallel dazu erfolgte der Verdau des α MHC Vektors mit dem Enzym Sac I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Mittels Klenow-Reaktion wurden die 5'-Überhänge aller Restriktionsprodukte mit dem Klenow-Enzym (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgefüllt. Danach erfolgte eine Dephosphorylierung des geglätteten α MHC Vektors mittels alkalischer Phosphatase Reaktion (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Die Ligation zum α MHC-eGFP-hMR bzw. α MHC-eGFP-hMR^{DEF} Plasmid erfolgte mit Hilfe einer Ligasereaktion, der sich eine bakterielle Transformation anschloss. Zur Kontrolle der Konstrukte wurde eine Sequenzierung durch die Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der fertigen Plasmid.

Die Herstellung der Plasmide erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. (Protokolle siehe Anhang, Tab. 14 bis 18)

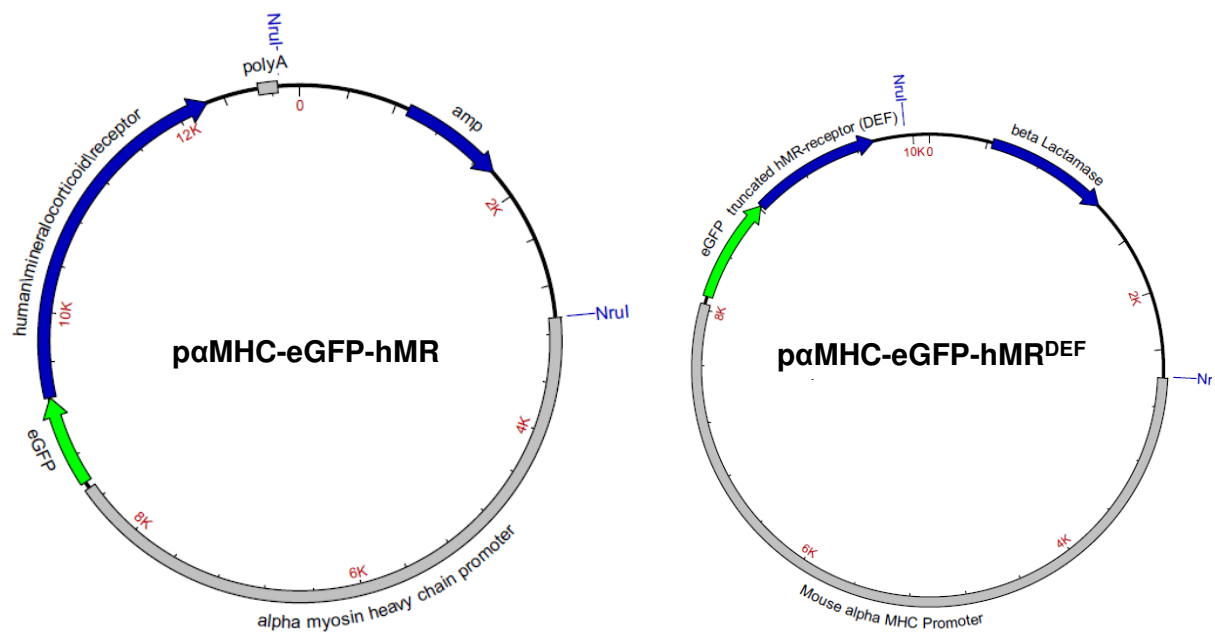


Abb. 5: Schematische Darstellung der Plasmide für die Pronukleus-Injektion.

3.1.2 Herstellung der transgenen Tiere

Zunächst wurden die Plasmide mittels Cäsiumchlorid-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigt und die Expressionskassette durch NrU I-Verdau aus dem Vektor herausgeschnitten (Abb. 6).

Die Vorkern-Injektion findet zu einem Zeitpunkt statt an dem die beiden Vorkerne (männlich und weiblich) gut sichtbar und noch nicht verschmolzen sind (Gordon et al. 1980). Die

befruchteten Eizellen werden aus den Eileiter superovulierter Weibchen (vor der Verpaarung mit FSH- und LH-Analoga behandelte Weibchen), die am Vorabend verpaart wurden, gewonnen. Die Mikro-Injektion der entsprechenden Konstrukte erfolgte in beide Pronuklei der befruchteten Oozyten (Zygote).



Abb. 6: Schematische Darstellung der Expressionskassette zur Herstellung transgener Mäuse (modifiziert nach Seiferth 2013).

α MHC-Promotor	Promotor der α schweren Kette des Myosins
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein
A/B	Coaktivator-Bindestelle
C	Bindedomäne für die DNA
D	Scharnierregion
E/F	Ligandenbindedomäne

Die transgenen Embryonen wurden einem scheinchwangeren Weibchen (hervorgegangen aus der Verpaarung mit einem sterilisierten Männchen) eingesetzt. Abbildung 7 zeigt die schematische Darstellung der Herstellung transgener Mäuse.

Die nach dreiwöchiger Tragezeit geborenen Tiere stellten die F₀-Generation der neuen α MHC hMR bzw. α MHC hMR^{DEF} Mauslinie dar.

Versorgt wurden die Tiere im 12:12 Hell-Dunkel-Zyklus mit handelsüblichem Labortierfutter (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum in schallisolierten, klimatisierten (21 °C bis 23 °C) Räumen.

Die Herstellung der TG Mauslinien erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität und dem Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) in Münster.

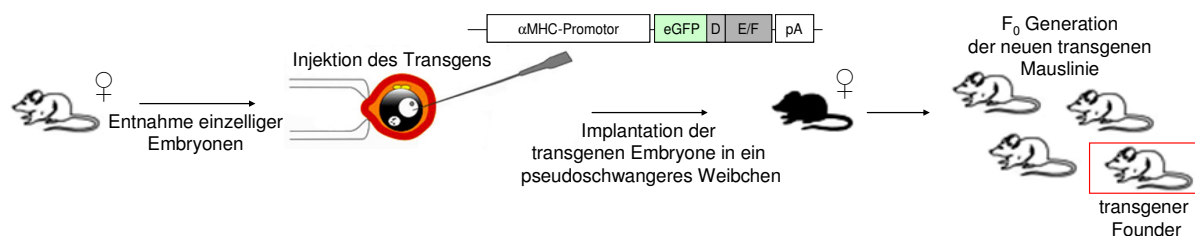


Abb. 7: Schematische Darstellung der Herstellung transgener Mäuse. Die Herstellung der α MHC hMR Mauslinie erfolgte mittels Pronukleus-Injektion in Maus-Oozyten. Die transgene Kassetten für den Mineralokortikoidrezeptor wurde durch NrU I-Verdau aus dem Ursprungsplasmid erzeugt, die herzspezifische Transkription des Konstrukts wird durch den α MHC-Promotor gesteuert. Identifiziert wurden die transgenen Mäuse mittels PCR mit spezifischen Primern (MHC-PCR-P1R und hMR-E-Seg-rev II). In gleicher Weise verlief die Generierung der α MHC hMR-Linie (modifiziert nach Taketo et al. 1991).

3.1.3 Isolierung genomischer DNA

Zur Bestimmung des Genotyps wurde von jeder Maus ein ca. 3 mm langes Stück des Schwanzes (in Narkose) abgeschnitten. Die eindeutige Zuordnung der Tiere wurde durch eine spezifische Ohrmarkierung gewährleistet. Die Schwanzprobe wurde mit 700 µl TE/SDS-Puffer und 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) über Nacht bei 55°C auf einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) unter permanenter Bewegung (10 000 rpm) zersetzt.

Am darauf folgenden Tag wurde zur Trennung der genomischen DNA von Lipiden und Proteinen eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Sambrook and Russell 2001). Jede Probe wurde mit 700 µl Phenol versetzt und gut gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14 000 x g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (Centrifuge 5415C, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Die wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch (24:1) hinzugefügt und gemischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14 000 x g für 5 min. Erneut wurde die wässrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 70 µl Natriumazetat (3 Molar) und 700 µl 100%igem Ethanol versetzt, gemischt und 10 min bei 14 000 x g zentrifugiert. Im darauf folgenden Schritt wurde das Sediment mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 10 min Zentrifugation bei 14 000 x g wurde der Ethanol verworfen und das Sediment kurz bei 65°C getrocknet. Gelöst wurde das DNA-Sediment in 50 µl TE-Puffer und 10 min bei 65°C in einem Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Bevor die Konzentration und Reinheit der doppelsträngigen (ds) DNA im Photometer (Eppendorf-BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt werden konnten, wurde die gelöste DNA mindestens 4 h bei 4°C gelagert werden.

3.1.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Zunächst wurde die isolierte genomische DNA mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 0,2-0,4 µg/µl verdünnt.

Mittels der in Tabelle 19 (siehe Anhang) angegebenen Primer betrug die Größe des erwarteten PCR-Produkts der αMHC hMR-Linie 2700 bp, das der αMHC hMR^{DEF} Linie 700 bp. Die PCR erfolgte jeweils in einem Biometra Thermocycler (Biometra T Gradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland).

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben direkt auf ein Agarosegel (1%) mit Ethidiumbromid (0,009 %) aufgetragen. Als DNA-Leiter wurde eine 1 kbp-DNA-Marker (GeneRuler™ Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei 120 mA (Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Das Gel wurde unter UV-Licht (256 nm) mit einem Geldokumentationssystem (AlphaDigiDoc™ RT-Geldokumentations-system mit AlphaEase®-FC-Software, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) fotografiert und anschließend analysiert. (Protokolle siehe Anhang, Tab. 20 bis 22)

3.1.5 Isolierung der RNA

Die isolierten Gewebe wurden zunächst mechanisch in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Von diesem Herzpulver wurden 50-100 mg mit 800 µl TRIzol® Reagenz (ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany) in einem RNase-freiem Reaktionsgefäß versetzt, mittels Ultraschall-Behandlung (Sonopuls Homogenisator HD2070, Bandelin, Berlin, Deutschland) für zweimal 30 sec bei 80% Leistung (entspricht einer Arbeitsfrequenz von 16 kHz) homogenisiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Zur Trennung der RNA von störenden Bestandteilen erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4°C (10 000 rpm, Beckmann Avanti™ 30 Centrifuge, GMI Ramsey MN, USA). Der Überstand wurde in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und 160 µl Chloroform hinzu gegeben, nach 15 sec kräftigem manuellem Mischen folgten erneut 3 min Inkubation bei RT. Um die wässrige von der organischen Phase zu trennen, wurde anschließend 15 min bei 4°C (10 000 rpm) zentrifugiert und die wässrige Oberphase in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt.

Die RNA wurden mit 400 µl Isopropanol ausgefällt. Dazu wurden die Proben gemischt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 4°C 15 min in der Kühlzentrifuge bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde zweimal mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen und zwischendurch kräftig gemischt.

Abschließend erfolgten 5 min Zentrifugation bei 4°C (10 000 rpm), der Überstand wurde verworfen und das Sediment 10 min bei RT getrocknet.

Gelöst wurde die RNA in 50 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-H₂O) und der RNA-Gehalt photometrisch (Eppendorf-BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

3.1.6 DNase Verdau

Eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA wurden mittels Verdau mit DNase I nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs, Ipswich, Großbritannien) aus den RNA-Proben entfernt. Die Inkubationsschritte der DNase-Reaktion erfolgten im Biometra Thermocycler (Biometra T Gradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). (Protokoll siehe Anhang, Tab. 23)

3.1.7 cDNA Synthese

Das Umschreiben der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers für die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR; Anhang, Tab. 24), für die quantitative Real-Time PCR (qPCR) nach modifiziertem Protokoll (Anhang, Tab. 28). Alle Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Inkubationsschritte der Reversen Transkription (RT) wurden in einem Biometra Thermocycler (Biometra T Gradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

3.1.8 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) diente dem qualitativen Nachweis des Transgens auf mRNA-Ebene im Herzgewebe. Dabei folgte auf die cDNA Synthese (Abschnitt 3.1.7) eine PCR mittels der in Tabelle 25 (siehe Anhang) aufgeführten Primer im Biometra Thermocycler (Biometra T Gradient, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). (Protokolle siehe Anhang, Tab. 26 und 27)

3.1.9 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die qPCR ermöglicht unter anderem Rückschlüsse auf die Transkription einzelner Gene im Vergleich zu Genen, deren mRNA durch eine Behandlung nicht verändert exprimiert wird, zu ziehen. Unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR®-Green I (bindet an doppelsträngige DNA) wird die zyklische Vermehrung des PCR-Produktes erfasst. Die Spezifität des Produkts kann nach Etablierung der entsprechenden Primer mittels einer

Schmelzkurve festgestellt werden, die durch graduelle Erhöhung der Temperatur auf 95°C erzeugt wurde.

Für jedes Gen erfolgte pro Tier jeweils eine Dreifachbestimmung der Ventrikelprobe (+RT) und eine Einfachbestimmung der negativ Kontrolle (cDNA-Synthese ohne Zugabe von Reverse Transkriptase = -RT). Für jedes untersuchte Gen wurde außerdem eine Wasser-Kontrolle (Leerprobe) mitgeführt. Die qPCR wurde in einem Stratagene Mx3005P System mittels Platin SYBR Green KIT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers und durch Zugabe des jeweils spezifischen Primerpaares durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte gemäß der $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode nach Livak et al. 2001, bei der die mRNA-Expression eines Zielgens auf die mRNA-Expression des nicht regulierten Referenzgens (18S rRNA) bezogen und anschließend die Differenz zwischen WT bzw. Kontrolle und untersuchtem Genotyp bzw. Stimulation gebildet wurde. Die Darstellung erfolgte als relative mRNA-Expression zur jeweils gewählten Referenz. Die mRNA-Expression des *eGFP* wurde ermittelt als Δ cycle threshold (Ct)-Wert aus den Ct-Werten des *eGFP* und des 18S rRNA Niveaus (Ct *eGFP* - Ct 18S rRNA).

Untersucht wurde die mRNA-Expression bestimmter Gene im Ventrikel (Tab. 1), die mit Fibrosierung (*Col1a1*, *Col3a1* und *Fn1*) und kardialer Hypertrophie (*Nppa*, *Nppb* sowie α MHC und β MHC) assoziiert sind. Daneben waren proinflammatorische Gene (*Serpina3*) von Interesse und solche die in der kardialen Erregungsbildung (*Kcnh2*) bzw. bei der elektromechanischen Kopplung (*Cacna1c*) eine wichtige Rolle spielen. Außerdem wurden die mRNA des endogenen MR (*Nr3c2*) und des eingebrachten Transgens (*eGFP*) analysiert. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt. (Protokolle siehe Anhang, Tab. 28 bis 30)

Gen	Abkürzung	verwendetes Synonym
18S ribosomale Ribonukleinsäure	<i>Rn18s</i>	18S rRNA
Kollagen Typ 1, Subtyp α 1	<i>Col1a1</i>	
Kollagen Typ 3, Subtyp α 1	<i>Col3a1</i>	
Fibronectin 1	<i>Fn1</i>	
Atriales natriuretisches Peptid/natriuretisches Peptid Typ A	<i>Nppa</i>	
Natriuretisches Peptid Typ B	<i>Nppb</i>	
Myosin, schwere Kette 6, α -Isoform	<i>Myh6</i>	α MHC
Myosin, schwere Kette 7, β -Isoform	<i>Myh7</i>	β MHC
Serpin Peptidase Inhibitor, Stamm A, Mitglied 3	<i>Serpina3</i>	
α -Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals hERG	<i>Kcnh2</i>	
α 1C-Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals	<i>Cacna1c</i>	
Nuklearrezeptor aus der Subfamilie 3, Gruppe C, Mitglied 2 endogener Mineralokortikoidrezeptor	<i>Nr3c2</i>	
verstärkt grün fluoreszierendes Protein	<i>eGFP</i>	

Tab. 1: Liste der mittels qPCR untersuchten Gene.

Gen	Sequenzen	Temperatur (°C)	Fragmentlänge (bp)
18S rRNA	5'-gtaaccggtgaacccatt-3' 5'-ccatccaatcggtagtagcg-3'	62	150
<i>Col1α1</i>	5'-acatggtcagctttgtggacc-3' 5'-taggccattgtgtgtatgcagc-3'	57	110
<i>Col3α1</i>	5'-tggtagaaaggacacagaggc-3' 5'-tccaacttcacccttagcacc-3'	64	283
<i>Fn1</i>	5'-ttaagctcacatgccagtg-3' 5'-tcgtcatagcacgtgcttc-3'	57	208
<i>Nppa</i>	5'-gtgcggtgccaacacagat-3' 5'-gcttcctcagctgctcactca-3'	64	123
<i>Nppb</i>	5'-ccagtctccagagcaattcaa-3' 5'-agctgtctctgggccatttc-3'	64	81
αMHC	5'-gctgacagatcgggagaatcag-3' 5'-cccctatggctgcaatgc-3'	64	121
βMHC	5'-actcaagcgggagaacaaga-3' 5'-acctgggacaactccaactg-3'	64	213
<i>Serpina3</i>	5'-gggagtcagctatcacagaggctg-3' 5'-gactgcagcatccattccaacgt-3'	60	160
<i>Kcnh2</i>	5'-cgcaagttcatcatcatcgctaa-3' 5'-aggaagcagctcccatttt-3'	64	242
<i>Cacna1c</i>	5'-tactggctcacagaagtgc-3' 5'-gatcttctccaccagga-3'	64	184
<i>Nr3c2</i>	5'-ttggtgtaattcaggtgga-3' 5'-gtgacaccagaagcctcat-3'	58	305
<i>eGFP</i>	5'-acaaccactacctgagcacc-3' 5'-cggactgtacagctcgtc-3'	60	109

Tab. 2: Primerliste für qPCR.

3.1.10 Protein-Isolation

Frisch isoliertes Gewebe wurde, nach dem Tod des jeweiligen Tieres so schnell wie möglich in isotoner Kochsalzlösung vom überschüssigem Blut befreit, direkt in ein Reaktionsgefäß mit 400 µl Homogenisierungspuffer bei Raumtemperatur gegeben und anschließend in Puffer mechanisch zerkleinert. Mittels Ultraschall-Behandlung (Sonopuls Homogenisator HD2070, Bandelin, Berlin, Deutschland) für dreimal 30 sec bei 75% Leistung (entspricht einer Arbeitsfrequenz von 15 kHz) wurden die Gewebestücke vollständig homogenisiert, die Homogenate für 30 min bei RT inkubiert und anschließend 30 min mit 14 000 x g bei RT zur Trennung der Proteine von unlöslichen Bestandteilen zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf Hamburg, Deutschland). Die im Überstand befindlichen Proteine wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt.

Die Proteinbestimmung der SDS-haltigen Proben erfolgte nach Lowry et al. 1951. Als Standard wurde aus Rinderserum gewonnenes Albumin verwendet.

3.1.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um eine gleichmäßige Lauffront im Trenngel zu erhalten, wurden zunächst alle Proben mit destilliertem Wasser und Probenpuffer (2x) auf gleiches Volumen eingestellt (max. 50 µl), anschließend 5 min bei 95°C denaturiert und schließlich in die Taschen des Sammelgels (4%) pipettiert. Freie Taschen wurden mit gleichem Volumen Probenpuffern (1x) gefüllt. Es wurden gleiche Proteinmengen für jede Probe aufgetragen.

Zur Konzentrierung der Proben wurde für das Sammelgel zunächst eine Spannung von 100 V (Stromquelle: Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) eingestellt, die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch im Trenngel (6% für hMR bzw. 10% für hMR^{DEF}) mit 200 V bei RT in der Minigel Twin[®] Gelkammer (Biometra Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) (Stromquelle: Biometra Standard Power Pack P25, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Ein handelsüblicher Molekulargewicht-Standard (PageRuler[™] Unstained Protein Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) wurde ungekocht als Marker eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte im Elektrophoresepuffer.

3.1.12 Protein-Transfer auf Nitrocellulosemembran

Der Transfer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) mittels Nassblottechnik erfolgte bei einer Gesamtstromstärke von 1,5 A etwa 2,5 h bei 4°C im Transferpuffer in einer Biorad Trans-Blot® Cell Transferkammer (Biorad, München, Deutschland, Stromquelle: Biorad Modell 200/2.0 Stromquelle, Biorad, München, Deutschland). Als Beladungs- und Qualitätskontrolle wurden die Membranen mit Ponceau-Rot angefärbt.

3.1.13 Immunologische Identifizierung von Proteinen

Der Nachweis der spezifischen Proteine konnte direkt auf der Nitrocellulose im Anschluss an die Ponceau-Färbung durchgeführt werden. Zur Detektion beider Proteine (hMR = 135 kDa, hMR^{DEF} = 62 kDa) wurde ein polyklonaler anti-GFP Antikörper (GFP (FL):sc-8334, Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, USA) eingesetzt.

Zum Auswaschen des Ponceau-Farbstoffs wurden die Membranen zweimal 10 min mit PBS (1x) gewaschen und anschließend 1 h mit Blockierungspuffer bei RT inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem 1. Antikörper (anti-GFP, 1:300) im Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Membranen einmal 1 min und fünfmal 5 min mit PBS (1x) gewaschen und als nächstes 2 h mit dem 2. Antikörper (anti-rabbit IG gekoppelt an Alkalische Phosphatase, 1:1000, Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, MO, USA) in Blockierungspuffer bei RT inkubiert. Abschließend wurde erneut mit PBS (1x) einmal 1 min und fünfmal 5 min gewaschen. Um die Membran für die Detektion zu äquilibrieren, wurde zweimal 2 min mit AP-Puffer gespült.

Zur Analyse wurden die jeweilige Membran mit einer NBT/BCIP-Mischung (siehe Anhang, Puffer und Lösungen) inkubiert bis Banden zu erkennen waren. Die alkalische Phosphatase Reaktion wurde durch Spülen der Membran mit Wasser gestoppt.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

3.2.1 Narkose

Die Dosierung des Narkosemittels erfolgte nach Körpergewicht (KG). Intraperitoneal (i.p.) wurde eine Kombination aus Midazolam 18 mg/kg KG (Midazolam 100 mg/50 ml Injektionslösung, Ratiopharm, Deutschland) und Ketamin 160 mg/kg KG (Ketamin-HCl (Racemat), Sigma-Aldrich, Deutschland, 120 mg/ml in isotoner Kochsalzlösung

Infusionslösung Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland) injiziert. Die Narkosetiefe wurde durch Testung des Zwischenzehenreflexes ermittelt. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde bei Wegfallen des Zwischenzehenreflexes erreicht (GV-Solas, Ausschuss für Anästhesie 2013).

Aufgehoben wurde die Narkose mit Hilfe des Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil 5 mg/kg KG (Flumazenil 0,1 mg/ml Injektionslösung, Fresenius Kabi, Deutschland).

3.2.2 Organpräparation

Für die Organentnahme wurden die Mäuse entweder direkt narkotisiert oder im Anschluss eines Experiments gegebenenfalls erneut betäubt.

Die Bauchhöhle wurde eröffnet, die Organe entnommen, mit isotoner Kochsalzlösung gespült und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Erfassung der Organgewichte erfolgte mittels elektronischer Waage (Mettler AT261 DeltaRange®, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland).

3.2.3 Elektrokardiographie (EKG)

Zur Untersuchung der elektrischen Erregung des Herzens wurden die Potenzialänderungen über die Haut mittels bipolarer Extremitäten-Ableitung nach Einthoven (I.) an narkotisierten Mäusen durch ein kommerzielles EKG-System (BioAmp, AD-Instruments, Spechbach, Deutschland) ermittelt.

Aufgezeichnet wurde das EKG durch Chart 5 (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Deutschland) und die relevanten Parameter anschließend ebenfalls mit dieser Software ausgewertet. Um zirkadiane Einflüsse zu minimieren, wurden das EKG zwischen neun und elf Uhr vormittags aufgezeichnet.

Analysiert wurden die Herzfrequenz (HF) und die Veränderung des Abstandes zwischen zwei Herzschlägen (RR-Intervall, RR), die Dauer der Erregungsbildung/-ausbreitung in den Vorhöfen (Vorhofdepolarisation, P-Welle) und den Kammern (intraventrikuläre Erregungsausbreitung, QRS-Komplex) sowie die Erregungsrückbildung (Kammerrepolarisation, T-Welle), die Dauer der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (Zeit, die die Erregung von den Vorhöfen zu den Ventrikeln benötigt = vom Anfang der P-Welle bis zum Beginn der Q-Zacke, PQ-Intervall) und die Dauer der gesamten

intraventrikulären Erregungsdauer (QT-Intervall), abhängig von der Herzfrequenz (QT-Intervall frequenzkorregiert = QT_c -Intervall).

Da die Erregungsleitung der Maus (400 bis 600 Schläge/min) um ein Vielfaches schneller ist als beim Menschen (ca. 70 Schläge/min), ergeben sich folgende Unterschiede zum EKG des Menschen: die Erregungsüberleitung von den Vorhöfen auf die Kammern bei der Maus als PR und nicht als PQ Intervall bezeichnet, wohingegen der Begriff QRS-Komplex für die Kammerdepolarisation weiterhin bestehen bleibt (Goldbarg et al. 1968).

Da der Beginn der Kammerrepolarisation (ST-Strecke) bei der Maus nicht eindeutig zu identifizieren ist, wurde das QT- bzw. das frequenzkorrigierte QT_c - Intervall für die Beurteilung der gesamten Kammerrepolarisation herangezogen.

Neben den oben genannten Parametern wurde besonders auf mögliche Arrhythmien und Überleitungsstörungen geachtet.

Die unterschiedlichen Abschnitte der Erregungsausbreitung im Maus-EKG sind in Abbildung 8 dargestellt.

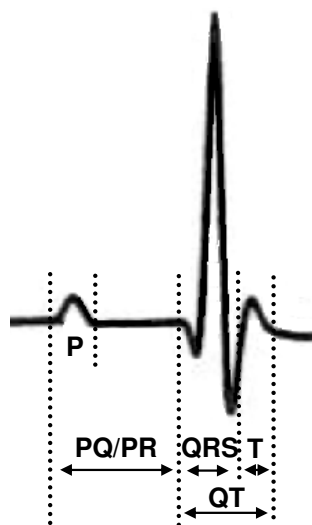


Abb 8: Schematische Darstellung des Elektrokardiogramms einer murinen Herzstromkurve (modifiziert nach Fortmüller 2004).

P	Dauer der intraatrialen Erregungsausbreitung
PR	Dauer der atrioventrikulären Erregungsüberleitung
QRS	Dauer der intraventrikulären Erregungsausbreitung
T	Dauer der intraventrikulären Erregungsrückbildung
QT	Dauer der gesamten intraventrikulären Erregung

3.2.4 Echokardiographie

Die linksventrikuläre Herzfunktion und -dimension wurde, nach Entfernung des Fells im Brustbereich durch handelsübliche Enthaarungscreme (Veet For Men Haarentfernungs-Gel, Reckitt Benckiser Group, Berkshire, Wales), anhand der zweidimensional gesteuerten Echokardiographie *in vivo* an narkotisierten Tieren mittels Vevo[®] 2100 Sonograph (Visual Sonics, Toronto, Kanada) nach Anleitung des Herstellers untersucht. Um zirkadiane Einflüsse zu minimieren, wurden die Ultraschalluntersuchungen ebenfalls vormittags zwischen neun und elf Uhr aufgezeichnet.

Zur Visualisierung der Gewebebewegung der linken Kammer während der Systole und der darauf folgenden Diastole (= 1 Herzzyklus) wurde das Herz in der Längsachse dargestellt und für die anschließende Quantifizierung im M-Mode (Zeitabhängige (X-Achse), eindimensionale Ultraschallmessung (Y-Achse)) aufgezeichnet.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Vevo 2100 1.1.2 (Visual Sonics, Toronto, Kanada) Software, nach Vorlage des Herstellers wie in Abbildung 9 dargestellt.

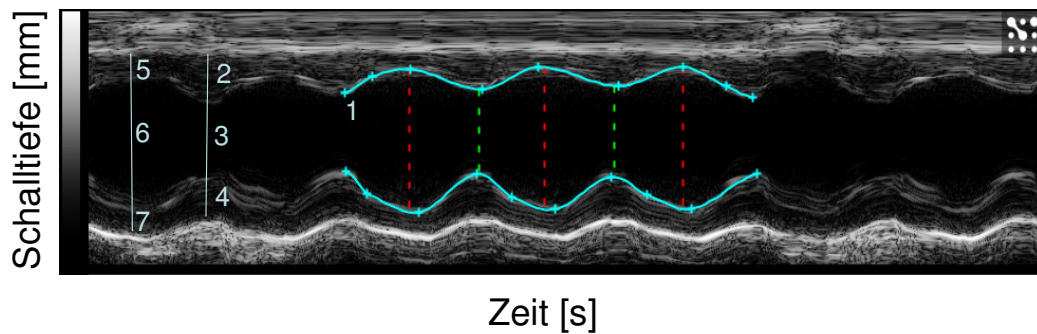


Abb. 9: Schematische Darstellung einer zweidimensionalen Echokardiographieaufnahme. Zur Analyse der Herzfunktion des Längsschnitts der linken Kammer wurde der so genannte M-Mode verwendet. Die Auswertung erfolgte über drei Herzzyklen (1). Die Dimensionen des Herzens wurden jeweils in der Systole (2-4) und in der vorangegangenen Diastole (5-7) bestimmt.

Die Herztätigkeit wurde jeweils über drei Herzzyklen erfasst und die Dimension der linken Kammer zusätzlich isoliert in der Systole und der vorangegangenen Diastole bestimmt, dabei wurden neben der Herzfrequenz (HF) auch das Herzzeitvolumen (HZV), die Ejektionsfraktion (= Prozentsatz des ausgeworfenen Blutvolumens, EF), das Verkürzungsvermögen (fractional shortening (gibt an, um wie viel Prozent sich der Ventrikel in der Systole gegenüber der Diastole verkürzt), FS), das Schlagvolumen (SV), das enddiastolische (EDV) und endsystolische Volumen, der enddiastolische (EDD) und endsystolische (ESD) Kammerdurchmesser, die diastolische (SD_D) und systolische Septumdicke (SD_S) sowie die diastolische (HD_D) und systolische Hinterwanddicke (HD_S) analysiert. Zur Beurteilung der Pumpleistung der Kammer wurde die ermittelte Ejektionsfraktion herangezogen.

3.2.5 Behandlung mit Kaliumcanrenoat

Den für die Zucht vorgesehenen α MHC hMR transgenen Weibchen wurde von Beginn der Verpaarung über das Trinkwasser der aktive Metabolit des Spironolactons, Kaliumcanrenoat (Canrenoic acid potassium salt, #C7287, Sigma-Aldrich, Deutschland), zugefüttert (30 mg/kg/d), um den MR zu blockieren. Bis zum Absetzen der Jungen wurde wöchentlich

das Gewicht der Mäuse ermittelt und die benötigte Menge Kaliumcanrenoat abhängig von Gewicht und Trinkmenge der Jungen und der Mutter neu berechnet.

Nach Absetzen und Genotypisierung der Nachkommen wurden die Wildtyp (WT) von den TG Mäusen getrennt und nur letztere weiterhin mit Kaliumcanrenoat versorgt.

3.2.6 β -Adrenozeptor-Stimulation

Nach Aufzeichnung eines Ruhe-EKGs bzw. des Ruhe-Ultraschalls wurde den Tieren 1 mg/kg des synthetischen Sympathomimetikums Isoprenalin (ISO, verdünnt in isotoner Kochsalzlösung Infusionslösung Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland) i.p. injiziert. Der anschließende Frequenzanstieg kennzeichnete eine erfolgreiche Stimulation. Bei maximaler Stimulation (Frequenzmaximum) erfolgte die Analyse der Erregungsausbreitung und der Funktion bzw. Dimension der linken Herzkammer.

Der Verlauf einer EKG-Messung unter ISO-Gabe ist beispielhaft in Abbildung 10 dargestellt.

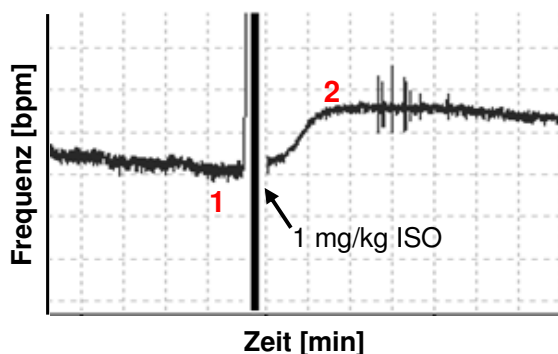


Abb. 10: Schematischer Verlauf einer EKG-Messung unter kurzfristiger β -Adrenorezeptor-Stimulation. Bei adäquater Narkosetiefe (1) erfolgte eine ISO-Injektion. Die maximale Stimulation wurde im Frequenzmaximum nach ISO-Injektion ermittelt (2).

3.2.7 Behandlung mit Aldosteron und Natriumchlorid

Um die Auswirkungen einer pathologischen hMR^{DEF} -Aktivierung durch ein unphysiologisches Aldosteron-Natriumchlorid-Verhältnis untersuchen zu können, wurde den fünf Monate alten Mäusen subkutan jeweils ein Aldosteron-freisetzendes Pellet (Freisetzungsrate $0,75 \mu\text{g/h} = 600 \mu\text{g/kg/d}$, Innovative Research of America, Sarasota, USA) implantiert und über den Versuchszeitraum von vier Wochen 1% Natriumchlorid (NaCl) oral über das Trinkwasser zugeführt (1 g NaCl gelöst in 100 ml Leitungswasser) (WT/Aldo+NaCl, hMR^{DEF} /Aldo+NaCl). Die Kontrolltiere wurden ebenfalls in Narkose versetzt, es wurde jedoch kein Pellet implantiert. Diese Mäuse erhielten Leitungswasser ad libitum über den gesamten Versuchszeitraum (WT/Kontrolle, hMR^{DEF} /Kontrolle).

Die EKG- und Ultraschall-Aufzeichnungen sowie die Ermittlung des Körpergewichts erfolgten an Tag 28 nach der (Pseudo-)Operation. Blut und Organe wurden zur weiteren Analyse entnommen.

3.3 Immunhistochemische Methoden

Für immunhistochemische Untersuchungen wurde die Herzspitze vom restlichen Ventrikel abgetrennt und in PBS-gepufferter 4% Formaldehydlösung für die anschließende Paraffin-Einbettung fixiert.

Für die pathohistologische Untersuchung wurden die Gewebeschnitte routinemäßig mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Zur Detektion der eGFP-gekoppelten Proteine wurden die angefertigten 4 µm dicken Querschnitt des Gewebes mittels Xylol und Ethanol-Gradient (absteigend) Spülung wieder vom Paraffin befreit. Für die immunhistochemische Analyse wurde das Antigen durch Erhitzen der entparaffinisierten Schnitte in 10 mM Natriumzitat-Puffer (pH 6) für 30 min bei 95°C (in einem haushaltsüblichen Dampfkochtopf) (Buchwalow and Boecker 2010) wieder zugänglich gemacht. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem polyklonalen anti-GFP Antikörper (1:300) über Nacht bei 4°C.

Für die Visualisierung des gebundenen 1. Antikörpers wurden die Schnitte, nach den entsprechenden Waschschritten mit PBS und anschließender Inkubation mit einem 0,6% H₂O₂-Methanol Gemisch (10 min, Inaktivierung endogener Peroxidasen), für 1 h bei RT mit biotinyliertem goat-anti-rabbit Antikörper (1:300, Dianova, Hamburg, Deutschland) behandelt. Final wurden die Zellkerne der Proben für 15 sec mit DAPI (5 µg/ml in PBS; Sigma, Deutschland) angefärbt und mit Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) fixiert (Buchwalow et al 2011).

Der an Streptavidin gebundene Fluoreszenzfarbstoff Alexa-547 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) des 2. Antikörper wurden mittels EnVision Horse Radish Peroxidase (HRP) System (DAKO Corporation, Hamburg, Deutschland) detektiert. Die HRP Aktivität wurde mit dem NovaRed substrate KIT (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) visualisiert.

Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Zeiss Mikroskop 'Axio Imager Z1' untersucht, die Bilder mittels einer AxioCam digital Mikroskop Kamera aufgenommen und mit der Software AxioVision image processing (Carl Zeiss Vision, Deutschland) ausgewertet.

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. rer. nat. habil. Igor B. Buchwalow (Institut für Hämatopathologie, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

3.4 Statistik

Alle aufgeführten Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Mit „n“ wird die Anzahl der Mäuse angegeben. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse mit Hilfe der Log-Rank-Statistik ermittelt. Statistisch Unterschiede wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U- bzw. des One-Sample-T-Tests (gegen Null) mit der Prism 5 Analyse-Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) berechnet. p-Werte kleiner 0,05 wurden dabei als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der transgenen Mauslinien

Der erste Schritt zur Erstellung der Arbeit war die Etablierung der transgenen Mauslinien nach Pronukleus-Injektion. Dafür wurden zunächst die transgenen Tiere ermittelt und sichergestellt, dass das eingebrachte Konstrukt sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in diesen Tieren reguliert und exprimiert wurde.

4.1.1 Nachweis des Transgens im Genom

Zur Etablierung der Mauslinien, wurden zunächst die aus der Pronukleus-Injektion hervorgegangenen transgenen Mäuse identifiziert. Hierzu erfolgte im ersten Schritt eine Analyse der genomischen DNA der F₀-Generation mittels PCR. Das hierbei verwendete Primerpaar lieferte bei WT-Tieren kein PCR-Produkt. Bei den α MHC hMR-Mäusen dagegen war ein Fragment mit der Länge von 2700 bp zu erwarten und bei den α MHC hMR^{DEF}-Tieren sollte ein PCR-Produkt mit 700 bp generiert werden. Wie in Abbildung 11 A und B zu sehen ist, konnten die vorausgesagten Produkte erfolgreich amplifiziert werden. Somit wurde belegt, dass die jeweiligen Konstrukte in die genomische DNA integriert waren.

Diese PCR wurde im Verlauf der Zucht routinemäßig zur Identifizierung der transgenen Nachkommen eingesetzt (Genotypisierung).

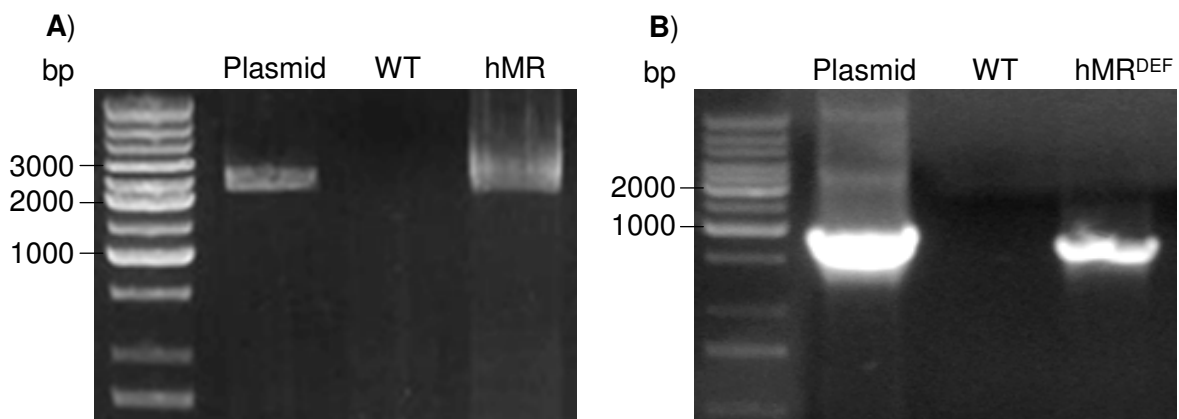


Abb. 11: Repräsentative Agarosegele der Genotypisierungs-PCR für α MHC hMR- (A) und für α MHC hMR^{DEF}-Proben (B).

4.1.2 Nachweis der kardialen Transkription der transgenen Rezeptoren

Um festzustellen, ob in den transgenen Tieren eine Transkription des integrierten Gens stattfand, erfolgte die Untersuchung der kardialen mRNA-Expression qualitativ mittels Reverse Transkriptase (RT)-PCR. Das jeweilige RT-PCR-Produkt hatte bei beiden Linien die erwartete Größe von 350 bp (Abb. 12A und B). Es konnte somit belegt werden, dass sowohl das hMR- als auch das hMR^{DEF}-Gen kardialen Transkriptionsprozessen unterlagen. Bei WT-Tieren zeigte sich keine entsprechende mRNA-Expression.

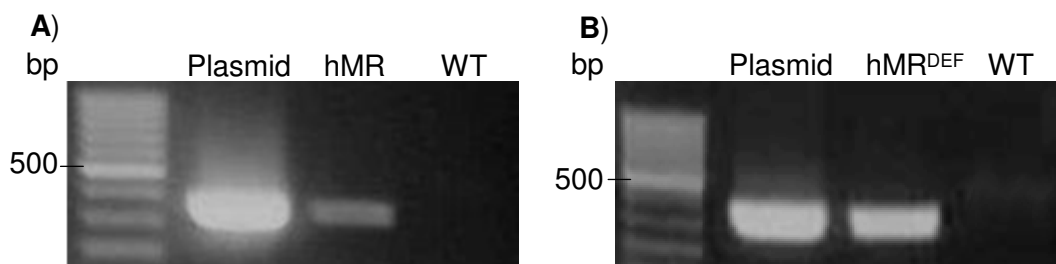


Abb. 12: RT-PCR. Dargestellt ist der qualitative Nachweis der mRNA-Expression für hMR (A) und hMR^{DEF} (B) in Herzen von transgenen und Wildtypieren.

4.1.3 Nachweis der kardialen Proteinexpression der transgenen Rezeptoren

Anhand einer Hämatoxylin und Eosin (HE)-Übersichtsfärbung sollte anschließend in Gewebeschnitten der formalin-fixierten Ventrikel untersucht werden, ob die kardiale Expression der transgenen Rezeptoren zu Veränderungen im Gewebe geführt hatte. Es konnten dabei jedoch keine pathologischen Veränderungen im Herzgewebe der transgenen Mäuse im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abb. 13A).

Um die Proteinexpression des jeweiligen transgenen Rezeptors zu betrachten, erfolgte eine immunhistochemische Färbung in den Gewebeschnitten mittels anti-GFP-Antikörper. Dabei zeigte sich bei den α MHC hMR-Hezen eine Akkumulation der Färbung in den Zellkernen der Kardiomyozyten. Im Herzgewebe der α MHC hMR^{DEF}-Mäuse war dagegen eine diffuse Färbung des Zytosols zu beobachten. Diese Verteilung der Färbung korreliert mit der fehlenden Translokation des aktivierten hMR^{DEF}-Rezeptors in den Zellkern. In den WT-Hezen war unter der Verwendung des anti-GFP-Antikörpers kein Signal detektierbar (Abb. 13B).

Anhand der immunhistochemischen Färbung konnten somit in den transgenen Tieren sowohl der hMR auch der hMR^{DEF} im Herzgewebe auf Proteinebene nachgewiesen werden. Das unterschiedliche Farbmuster belegte außerdem die verschiedenen Eigenschaften der beiden transgenen Rezeptoren.

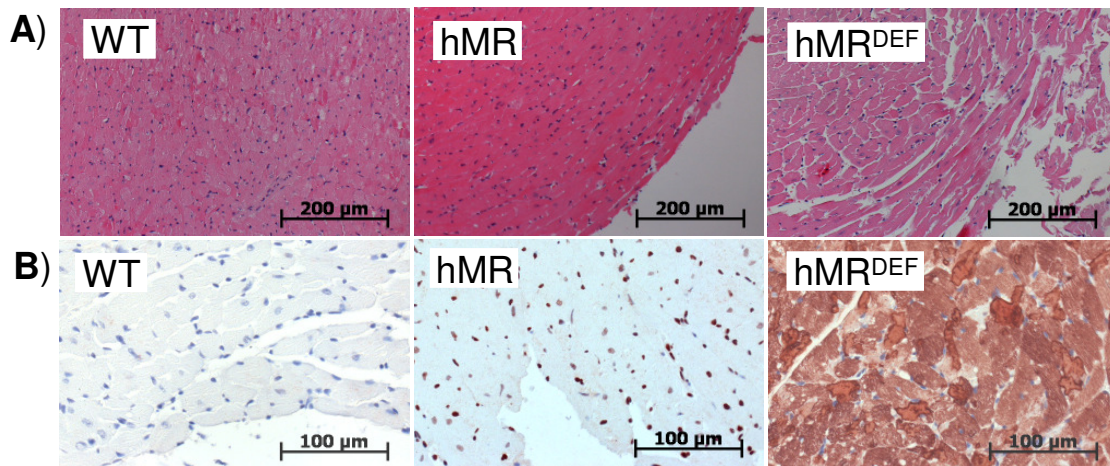


Abb. 13: Histologische Untersuchungen. Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen der Gewebeschnitte von WT-, hMR- und hMR^{DEF}-Herzen. A) HE-Übersichtsfärbung (Vergrößerung 20x), B) anti-GFP-Färbung (Vergrößerung 40x).

Ergänzend zum Nachweis der kardialen Proteinexpression durch die Immunhistochemie sollte mittels Western Blot-Technik untersucht werden, ob die transgenen Rezeptoren auf Proteinebene spezifisch im Herzen exprimiert wurden. Unter der Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers konnte bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen dabei die spezifische kardiale Proteinexpression des an den transgenen Rezeptor gekoppelten eGFP belegt werden. In Lunge, Leber und Niere dieser Tiere war ebenso wie im Herzen von WT-Mäusen kein Protein mit der entsprechenden Größe detektierbar (Abb. 14). Der erfolgreiche Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran wurde dabei mittels Ponceau-Färbung überprüft (siehe Anhang).

Das Western Blot-Ergebnis bestätigte somit die erwartete spezifische kardiale Transkription und Translation des transgenen Rezeptors in den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen.

Ein Nachweis des kompletten Rezeptors (hMR) auf Proteinebene war trotz der Verwendung unterschiedlicher Antikörper (anti-GFP, anti-MR) und Puffersysteme mittels Western Blot-Technik bei den α MHC hMR-Tieren nicht möglich.



Abb. 14: Western Blot-Analyse. Dargestellt ist der Nachweis der spezifischen kardialen Proteinexpression des transgenen Rezeptors in α MHC hMR^{DEF}-Mäusen.

4.1.4 Zucht der transgenen Mauslinien

Durch die zufällige Integration des α MHC hMR-Konstrukts mittels der Pronukleus-Injektion in das Genom stand zunächst ein weibliches Zuchttier (Founder) für die Etablierung des Modells zur Untersuchung der genomischen Effekte des MR zur Verfügung (hMR-Linie). Durch Inzuchtverpaarung mit WT-Tieren wurden bei normaler Wurfgröße (7 bis 11 Junge) zwar α MHC hMR-Mäuse geboren, jedoch verstarben alle transgenen Jungtiere innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt (Abb. 15). Da keine WT-Geschwisterstiere starben, wurde die postnatale Letalität der transgenen Tiere vermutlich durch die kardiale Expression des hMR verursacht.

Aus einer erneuten Pronukleus-Injektion gingen vier α MHC hMR-Tiere für einen zweiten Zuchtversuch (1♂ und 3♀, F₀-Generation) hervor. Die F₁-Generation der Inzuchtverpaarung führte zu vier α MHC hMR-Nachkommen (3♂ und 1♀). Da auch bei diesen transgenen Tieren davon ausgegangen werden musste, dass die kardiale Expression des hMR letal war, wurde ihnen nach erfolgreicher Genotypisierung der synthetische MR-Inhibitor Kaliumcanrenoat (K-Canrenoat, 30 mg/kg/d) über das Trinkwasser zugefüttert. Die MR-Inhibition wurde während der anschließenden Verpaarungen bis zu einem definierten Zeitpunkt vor den Experimenten fortgesetzt, da nicht bekannt war, ab welchem Zeitpunkt eine Aktivierung des hMR die Letalität einsetzte.

Unter der Kaliumcanrenoat-Behandlung bekam nur ein transgenes Tier (♀) der F₁-Generation transgene Nachkommen (F₂-Generation). Aus der F₂-Generation gingen unter der Kaliumcanrenoat-Behandlung keine weiteren α MHC hMR-Tiere mehr hervor. Das Ausbleiben weiterer transgener Nachkommen ist hier vermutlich durch die antiandrogene Wirkung des Kaliumcanrenoats bedingt. Ein Zuchtversuch mit WT, die niemals mit Kaliumcanrenoat behandelt wurden, war jedoch ebenfalls nicht erfolgreich. Ein vorzeitiges Absetzen des MR-Inhibitors wurde nicht in Betracht gezogen, da die Gefahr bestand, dass die Zuchttiere aufgrund der MR-Aktivierung frühzeitig versterben könnten. Somit standen für die Untersuchung der kardialen α MHC hMR-Überexpression jedoch nur wenige Tiere aus der F₂-Generation zur Verfügung ($n_{\text{total}} = 20$). Eine langfristige Etablierung der α MHC hMR-Linie war somit im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

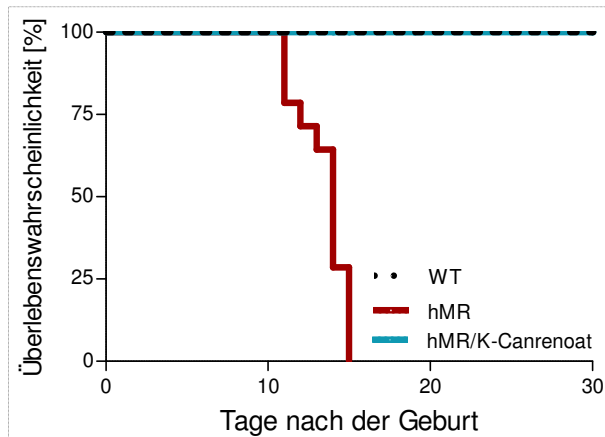


Abb. 15: Kaplan-Meier Statistik. Dargestellt ist die postnatale Überlebenswahrscheinlichkeit für α MHC hMR-Tiere mit und ohne Gabe des MR-Inhibitors Kaliumcanrenoat (hMR/K-Canrenoat). $p < 0,05$ ohne Kaliumcanrenoat, $n = 15$ bis 33. $p > 0,05$ nach Gabe von Kaliumcanrenoat, $n = 20$ bis 45.

Parallel zur Etablierung des α MHC hMR-Linie erfolgte die Etablierung des Mausmodells für die nichtgenomischen Effekte des MR (α MHC hMR^{DEF}-Linie).

Nach der Pronukleus-Injektion des α MHC hMR^{DEF}-Konstrukts standen zwei Founder (1♂ und 1♀) zur Verfügung, um das Tiermodell der kardialen α MHC hMR^{DEF}-Überexpression zu etablieren. Die Verpaarung der α MHC hMR^{DEF}-Tiere erfolgte, wie bei der α MHC hMR-Linie, mit WT-Mäusen nach dem Inzuchtmodell und wies ebenfalls eine normale Wurfgröße (7 bis 11 Jungen) auf.

In der F₀-Generation bekam nur ein Founder (♀) transgene Nachkommen. Die weitere Zucht verlief ohne Probleme, da keine erhöhte Letalität zu beobachten war (Abb. 16) und auf die Gabe von Kaliumcanrenoat verzichtet werden konnte. Die Etablierung der α MHC hMR^{DEF}-Linie konnte somit direkt nach der ersten Pronukleus-Injektion erfolgen.

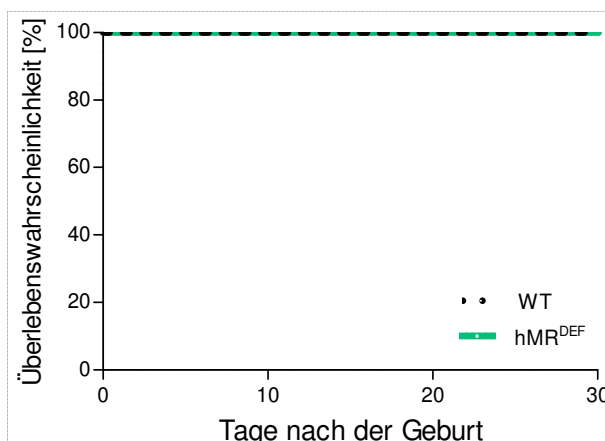


Abb. 16: Kaplan-Meier Statistik. Dargestellt ist die postnatale Überlebenswahrscheinlichkeit für α MHC hMR^{DEF}-Tiere bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung von der Mutter. $p > 0,05$, $n = 158$ bis 244.

4.2 Kardialer Phänotyp der hMR^{DEF}-überexprimierenden Mäuse

Nach erfolgreicher Etablierung der transgenen Mauslinien wurden die kardialen Phänotypen der beiden hMR-Varianten untersucht. Hierbei diente die α MHC hMR-Linie der Differenzierung zwischen genomischen und nichtgenomischen Effekten. Es erfolgte zunächst eine umfassende kardiale Untersuchung sechs Monate alter α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden dieselben Parameter bei zwölf Monate alten Mäusen ebenfalls erfasst.

Für die Untersuchung der sechs Monate alten α MHC hMR-Mäuse wurde einen Monat vor den Versuchen der MR-Inhibitor Kaliumcanrenoat abgesetzt und somit die Blockierung des MR aufgehoben. Die Tiere erhielten über die verbleibenden vier Wochen Leitungswasser ad libitum. Bis zum Versuchszeitpunkt verstarben keine Mäuse dieser Gruppe (Abb. 17A).

Die α MHC hMR-Mäuse der zwölf Monate alten Untersuchungsgruppe erhielten den MR-Inhibitor bis zum Alter von elf Monaten. Analog zu den mit sechs Monaten untersuchten Tieren, bekamen diese Mäuse anschließend über die verbleibenden vier Wochen Leitungswasser nach Bedarf. Ohne MR-Inhibition verstarben in dieser Gruppe ebenfalls keine α MHC hMR-Mäuse bis zum Untersuchungszeitpunkt mit zwölf Monaten (Abb. 17B).

WT- und α MHC hMR^{DEF}-Tiere bekamen während der gesamten Lebenszeit Leitungswasser nach Bedarf.

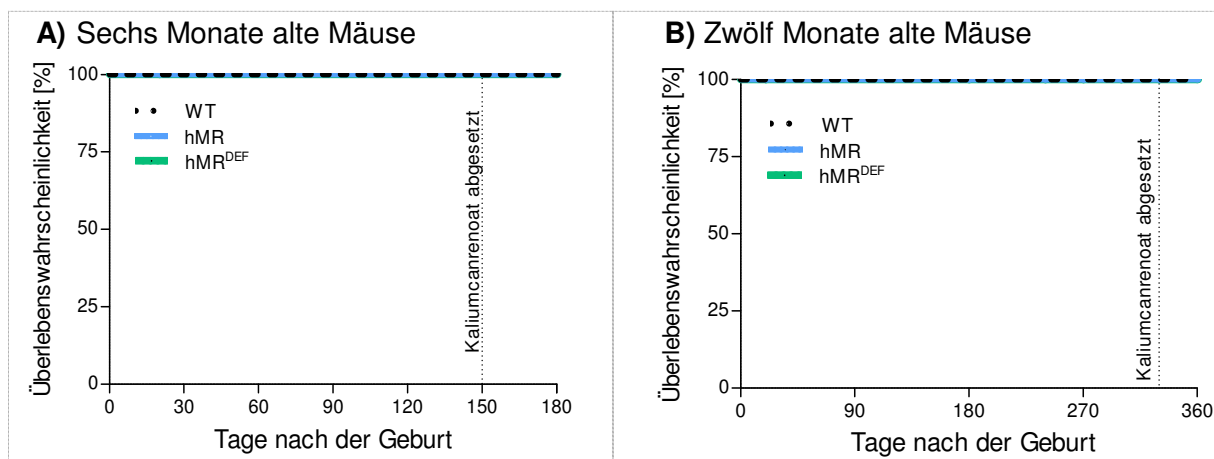


Abb. 17: Kaplan-Meier Statistik. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit für α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Nachkommen bis zum Alter von sechs (A) und zwölf Monaten (B). $p > 0,05$ gegenüber WT, $n = 6$ bis 244.

4.2.1 Morphologische Parameter

Um den Phänotyp der α MHC hMR^{DEF}-Mäuse genauer zu charakterisieren, wurden zunächst morphologische Parameter untersucht. Hierbei wurde der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht (relatives Herzgewicht) zur Beurteilung der kardialen Masse herangezogen.

In der Gruppe der sechs Monate alten Tiere zeigte sich bei den α MHC hMR-Mäusen ein erhöhtes relatives Herzgewicht. Das relative Herzgewicht der α MHC hMR^{DEF}-Tiere war gegenüber den WT-Tieren unverändert (Tab. 3).

Die zwölf Monate alten α MHC hMR-Mäuse wiesen im Vergleich zu den WT-Tieren ein reduziertes Körpergewicht auf, das relative Herzgewicht war gegenüber dem WT jedoch nicht verändert. Zwischen WT- und zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tieren konnten keine Unterschiede im relativen Herzgewicht festgestellt werden (Tab. 3).

	Sechs Monate			Zwölf Monate		
	WT	hMR	hMR ^{DEF}	WT	hMR	hMR ^{DEF}
Körpergewicht (g)	27,1 ± 0,8	24,9 ± 1,0	29,1 ± 1,2	32,0 ± 1,7	26,9 ± 1,1 [#]	31,1 ± 1,5
Herzgewicht (mg)	113,7 ± 3,9	129,3 ± 6,8 [*]	124,4 ± 6,2 [*]	158,1 ± 5,9	139,8 ± 7,9	138,7 ± 6,9 [#]
Relatives Herzgewicht (mg/g)	4,2 ± 0,1	5,2 ± 0,12 [*]	4,3 ± 0,1	4,9 ± 0,2	5,1 ± 0,3	4,5 ± 0,2

Tab. 3: Morphologische Parameter. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM des Körpergewichts, Herzgewichts und relativen Herzgewichts von sechs und zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren. ^{*}p < 0,05 gegenüber WT mit sechs Monaten, [#]p < 0,05 gegenüber WT mit zwölf Monaten, n = 5 bis 9.

Die Untersuchung der altersabhängigen Änderung ergab bei den WT-Tieren eine Zunahme der obigen Parameter, wie Abbildung 18 zeigt.

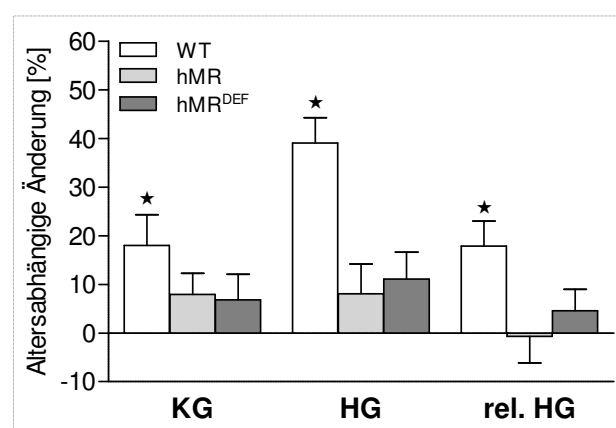


Abb. 18: Altersabhängige Änderung der morphologischen Parameter. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der prozentualen Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. ^{*}p < 0,05 gegenüber der entsprechenden Kontrolle mit sechs Monaten, n = 5 bis 9 pro Gruppe.

4.2.2 Untersuchung der kardialen Transkription des endogenen MR

Um den Einfluss der transgenen Rezeptoren auf die Transkription des endogenen MR (*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2, Nr3c2*) beurteilen zu können, wurde zunächst die kardiale Transkription des jeweiligen transgenen Rezeptors untersucht.

Bei den sechs Monate alten Tieren zeigte sich dabei, dass der relative Schwellenwert (ΔCt) in $\alpha\text{MHC hMR}$ -Herzen höher war als in $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Herzen (Tab. 4). Dies bedeutete, dass bei den $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Tieren eine 147-fach höhere mRNA-Menge des *eGFP*, und damit des transgenen Rezeptors, im Vergleich zu den $\alpha\text{MHC hMR}$ -Mäusen gefunden werden konnte.

Bei den zwölf Monate alten Tieren war in $\alpha\text{MHC hMR}$ -Herzen ebenfalls ein höherer relativer Schwellenwert (ΔCt) als in $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Herzen zu beobachten (Tab. 4). Hier wurde bei den $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Tieren eine 13,9-fach höhere mRNA-Menge des *eGFP* im Vergleich zu den $\alpha\text{MHC hMR}$ -Mäusen gefunden.

Somit war in beiden Altersgruppen von einer größeren hMR^{DEF} -mRNA-Menge auszugehen.

	Sechs Monate		Zwölf Monate	
	hMR	hMR ^{DEF}	hMR	hMR ^{DEF}
$\Delta\text{Ct } e\text{GFP}$	13,8 ± 0,5	6,6 ± 0,4	11,9 ± 0,5	8,1 ± 0,2

Tab. 4: Ergebnisse der mRNA-Expression für *eGFP*. ΔCt -Mittelwerte \pm SEM der *eGFP*-mRNA-Expression von $\alpha\text{MHC hMR}$ - und $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Mäusen im Alter von sechs und zwölf Monaten. $p < 0,05$, $n = 5$ bis 9 pro Gruppe.

Altersabhängig nahm die *eGFP*-mRNA-Expression folglich bei den $\alpha\text{MHC hMR}$ -Tieren zu (+3,7-fach), bei den $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Mäusen dagegen ab (-2,8-fach).

Die kardiale Transkription des endogenen MR (*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2, Nr3c2*) wurde anschließend ebenfalls mittels qPCR untersucht und das relative mRNA-Verhältnis zwischen transgenen und WT-Mäusen analysiert.

Bei den sechs Monate alten Tieren wurde dabei eine größere mRNA-Menge sowohl bei den $\alpha\text{MHC hMR}$ - (1,7-fache mRNA-Expression) als auch bei den $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Mäusen (2,2-fache Expression) im Vergleich zu WT-Herzen festgestellt (Abb. 19A).

In Abbildung 19B ist die kardiale mRNA-Expression von *Nr3c2* bei zwölf Monate alten Tieren dargestellt. Hier zeigte sich eine höhere mRNA-Expression bei den $\alpha\text{MHC hMR}$ - gegenüber den WT-Mäusen (29,9-fach). Bei den zwölf Monate alten $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Tieren war die

kardiale mRNA-Menge dagegen im Vergleich zu WT-Tieren nicht erhöht (1,2-fache Expression).

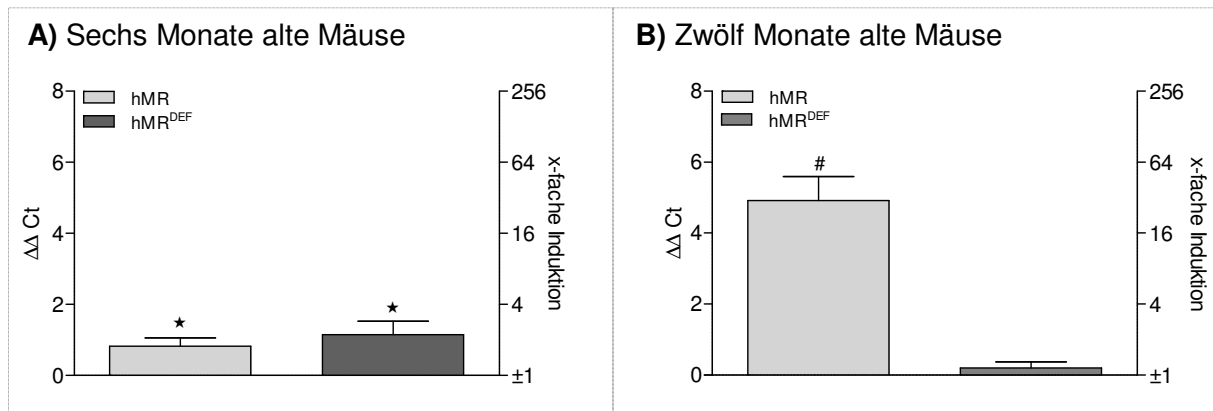


Abb. 19: Ergebnisse der Untersuchung der kardialen Transkription des endogenen MR (*Nr3c2*). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$, x-fache Induktion) für *Nr3c2* bei αMHC hMR- und αMHC hMR^{DEF}-Mäusen im Vergleich zur kardialen WT-mRNA-Expression mit sechs (A) und zwölf Monaten (B). * $p < 0,05$ gegenüber WT mit sechs Monaten, # $p < 0,05$ gegenüber WT mit zwölf Monaten, $n = 5$ bis 9 pro Gruppe.

Abbildung 20 zeigt die altersabhängige Änderung der endogenen *Nr3c2*-mRNA-Menge. Diese nahm sowohl bei WT- und als auch bei αMHC hMR-Tieren zu, bei den αMHC hMR^{DEF}-Mäusen war sie dagegen unverändert.

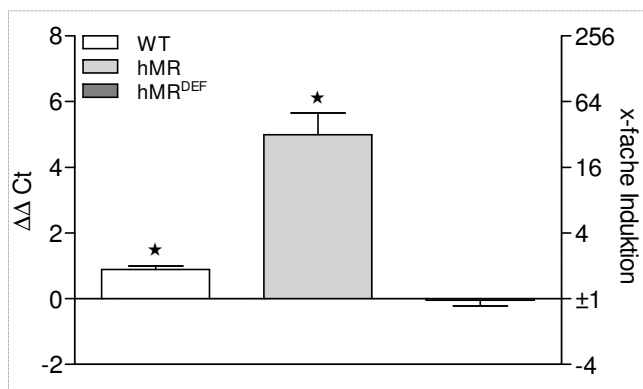


Abb. 20: Ergebnisse der altersabhängigen Untersuchung der kardialen Transkription des endogenen MR (*Nr3c2*). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$, x-fache Induktion) für *Nr3c2* zwischen sechs und zwölf Monate alten WT-, αMHC hMR- und αMHC hMR^{DEF}-Herzen. * $p < 0,05$ gegenüber der sechs Monate alten Kontrolle, $n = 5$ bis 9 pro Gruppe.

4.2.3 Untersuchung der kardialen Transkription Herzinsuffizienz-assoziiierter Gene

Um einen möglichen direkten Einfluss des hMR bzw. einen indirekten Einfluss des hMR^{DEF} auf die kardiale Transkription zu untersuchen, wurden im weiteren Verlauf verschiedene

Gene genauer betrachtet, deren mRNA-Expression bei einer Herzinsuffizienz typischerweise verändert sein könnten. Dabei dienten das atriale natriuretische Peptid/ natriuretische Peptid Typ A und das natriuretische Peptid B (*Nppa*, *Nppb*) sowie die Myosinisoform α und β (α MHC, β MHC) als Hinweis auf eine Hypertrophie. Die α 1 Untereinheit des Kollagens vom Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col3a1*) und das Fibronectin 1 (*Fn1*) wurden als Hinweis auf den kardialen Fibrosierungsgrad untersucht. Aufschlüsse über die elektrophysiologischen Veränderungen in den transgenen Herzen gaben die α -Untereinheit des hERG-Kaliumkanals (*Kcnh2*) und die α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*). Als Hinweis auf kardiale Entzündungen wurde der Serinpeptidase Inhibitor/Akut-Phase-Protein 3 (*Serpina3*) herangezogen.

Die Untersuchung der kardialen Transkription der entsprechenden Gene zeigte, dass bei den sechs Monate alten α MHC hMR-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen die mRNA-Menge von α MHC und β MHC erhöht war. Bei den Fibrose-assoziierten Genen trat bei diesen Tieren außerdem eine verminderte *Fn1*-Transkription gegenüber den WT-Tieren auf. Die Gene der untersuchten α -Untereinheiten der Ionenkanäle und des Akut-Phase-Proteins wiesen eine erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zum WT auf (Abb. 21A). Bei den sechs Monate alten Mäusen, die die trunkierte Version des MR im Herzen exprimierten (α MHC hMR^{DEF}) konnten im Vergleich zu WT-Tieren erhöhte mRNA-Mengen für *Nppa*, *Nppb*, β MHC, *Col1a1*, *Col3a*, *Fn1* und *Cacna1c* detektiert werden. Die α MHC- und *Kcnh2*-mRNA-Expressionen in diesen Herzen waren gegenüber den WT-Hezen unverändert bzw. letztere eher vermindert (Abb. 21A).

Untersuchungen der kardialen Transkription auf mRNA-Niveau der zwölf Monate alten Mäuse zeigten für die α MHC hMR-Tiere eine gesteigerte mRNA-Expression im Vergleich zum WT für fast alle Gene, die einzige Ausnahme bildete *Col1a1*, dessen mRNA-Expression keinen Unterschied zum WT aufwies (Abb. 21B). Bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen war lediglich die mRNA-Menge von *Nppa* gegenüber der WT-mRNA-Expression erhöht, wie Abbildung 21B zeigt.

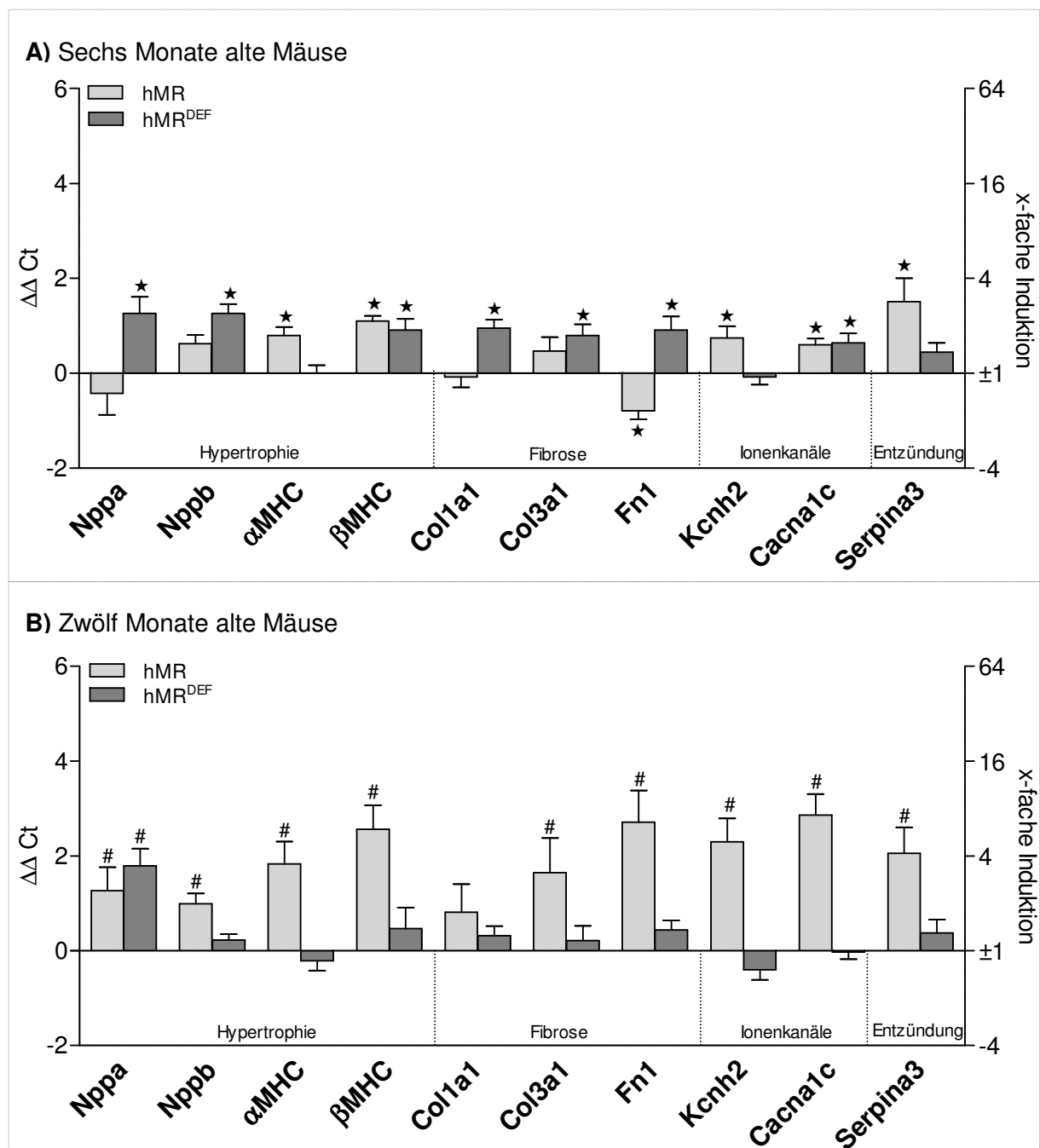


Abb. 21: Ergebnisse der Untersuchung der kardialen Transkription. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$, x-fache Induktion) von sechs (A) und zwölf Monaten (B) alten αMHC hMR- und αMHC hMR^{DEF}-Mäusen im Vergleich zur kardialen WT-mRNA-Expression. * $p < 0,05$ gegenüber WT mit sechs Monaten, # $p < 0,05$ gegenüber WT mit zwölf Monaten, $n = 5$ bis 9 pro Gruppe.

Natriuretisches Peptid Typ A und B (*Nppa*, *Nppb*), Myosinisoform α und β (αMHC , βMHC), $\alpha 1$ -Untereinheit des Kollagens vom Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col3a1*), Fibronectin 1 (*Fn1*), α -Untereinheit des hERG-Kaliumkanals (*Kcnh2*), α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*), Serinpeptidase Inhibitor/Akut-Phase-Protein (*Serpina3*).

Die Untersuchung der altersabhängigen Änderung ergab für die WT-Mäuse eine Steigerung der mRNA-Mengen für die Hypertrophie-assoziierten Gene *Nppb*, αMHC und βMHC . Bei den

Fibrose-assoziierten Genen fiel auf, dass die Transkription von *Col3a1* anstieg, die von *Fn1* dagegen abnahm. Erhöht war altersabhängig in den WT-Herzen ebenfalls die mRNA-Expression der α -Untereinheiten der untersuchten Ionenkanäle (*Kcnh2*, *Cacna1c*) sowie des Akut-Phase-Proteins *Serpina3* (Abb. 22). Bei den α MHC hMR-Mäusen stieg altersabhängig die kardiale Transkription aller untersuchten Gene stark an, wie Abbildung 22 zeigt. Dagegen konnte in den α MHC hMR^{DEF}-Herzen altersabhängig nur für *Nppa* und *Serpina3* eine erhöhte Transkription festgestellt werden. Bei den Fibrose-assoziierten Genen wurde eine Abnahme der *Fn1*-mRNA-Expression beobachtet, wobei die weiterhin untersuchten mRNA-Mengen unverändert waren (Abb. 22).

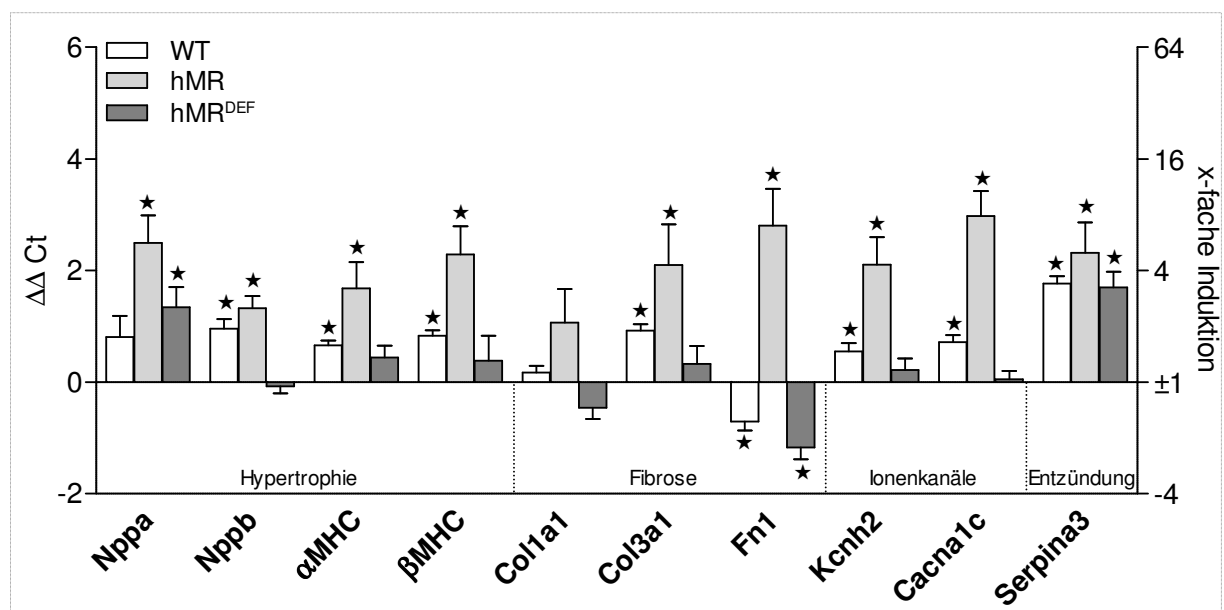


Abb. 22: Ergebnisse der altersabhängigen Untersuchung der kardialen Transkription. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Änderungen der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta$ Ct, x-fache Induktion) zwischen sechs und zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Herzen. * $p < 0,05$ gegenüber der sechs Monate alten Kontrolle, $n = 5$ bis 9 pro Gruppe.

Natriuretisches Peptid Typ A und B (*Nppa*, *Nppb*), Myosinisoform α und β (α MHC, β MHC), α 1-Untereinheit des Kollagens vom Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col3a1*), Fibronectin 1 (*Fn1*), α -Untereinheit des hERG-Kaliumkanals (*Kcnh2*), α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*), Serinpeptidase Inhibitor/Akut-Phase-Protein (*Serpina3*).

4.2.4 Elektrokardiographische Untersuchung

Die aufgrund der die Anwesenheit der jeweiligen hMR-Variante erwarteten Veränderungen im kardialen Erregungsleitungssystem wurden bei den transgenen (TG) Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren mittels EKG untersucht.

Im Vergleich zu WT-Tieren zeigten die sechs Monate alten α MHC hMR-Tiere im EKG eine verlängerte gesamte intraventrikuläre Erregungsdauer (QT-Intervall) sowie eine Verlängerung des entsprechenden frequenzkorrigierten Intervalls (QT_c-Intervall). Weitere Unterschiede zum WT waren nicht vorhanden (Tab. 5). Bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen dieser Altersgruppe traten keine Unterschiede gegenüber den WT-Tieren auf (Tab. 5).

Zwischen zwölf Monate alten WT- und α MHC hMR-Tieren zeigte sich eine verkürzte intraventrikuläre Erregungsausbreitung (QRS-Komplex). Jedoch waren keine Unterschiede im EKG zwölf Monate alter α MHC hMR-Tiere gegenüber dem WT-EKG zu erkennen (Tab. 5). Bei den α MHC hMR^{DEF}-Tieren dieser Altersgruppe konnten keine Unterschiede im EKG-Vergleich gegenüber den WT-Mäusen beobachtet werden (Tab. 5).

	Sechs Monate			Zwölf Monate		
	WT	hMR	hMR ^{DEF}	WT	hMR	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	257,6 ± 24,4	252,4 ± 23,5	318,1 ± 30,2	362,0 ± 36,5	295,0 ± 17,4	412,4 ± 40,5
RR-Intervall (ms)	248,2 ± 21,1	248,6 ± 23,8	205,7 ± 31,6	180,6 ± 19,2	207,0 ± 12,7	164,4 ± 24,6
PR-Intervall (ms)	34,2 ± 1,8	34,6 ± 1,4	32,8 ± 1,3	34,9 ± 1,3	31,9 ± 0,5	34,2 ± 1,1
P-Welle (ms)	14,8 ± 0,5	13,8 ± 1,0	14,1 ± 0,8	13,3 ± 0,8	13,8 ± 0,8	12,7 ± 0,8
QRS-Komplex (ms)	14,1 ± 0,8	13,3 ± 0,9	14,9 ± 0,6	15,5 ± 0,7	13,2 ± 0,3 [#]	15,8 ± 0,8
QT-Intervall (ms)	29,4 ± 2,1	35,7 ± 2,7 [*]	25,9 ± 1,9	28,6 ± 1,4	31,6 ± 2,3	29,3 ± 2,0
QT _c -Intervall (ms)	59,9 ± 3,9	72,0 ± 4,3 [*]	57,6 ± 2,5	65,5 ± 4,1	69,4 ± 3,9	75,0 ± 5,6

Tab. 5: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der EKG-Aufzeichnungen von sechs und zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren. ^{*}p < 0,05 gegenüber WT mit sechs Monaten, [#]p < 0,05 gegenüber WT mit zwölf Monaten, n = 6 bis 9.

Altersabhängig war bei den WT-Mäusen die Herzfrequenz erhöht, respektive das RR-Intervall verkürzt (Abb. 23). Bei den α MHC hMR-Tieren verminderte sich altersabhängig die Dauer des RR-Intervalls sowie der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (Abb. 23). Die α MHC hMR^{DEF}-Mäuse zeigten altersabhängig eine erhöhte Herzfrequenz und eine Verlängerung des QT_c-Intervalls (gesamte intraventrikulären Erregungsleitung, frequenzkorrigiert), wie in Abbildung 23 dargestellt.

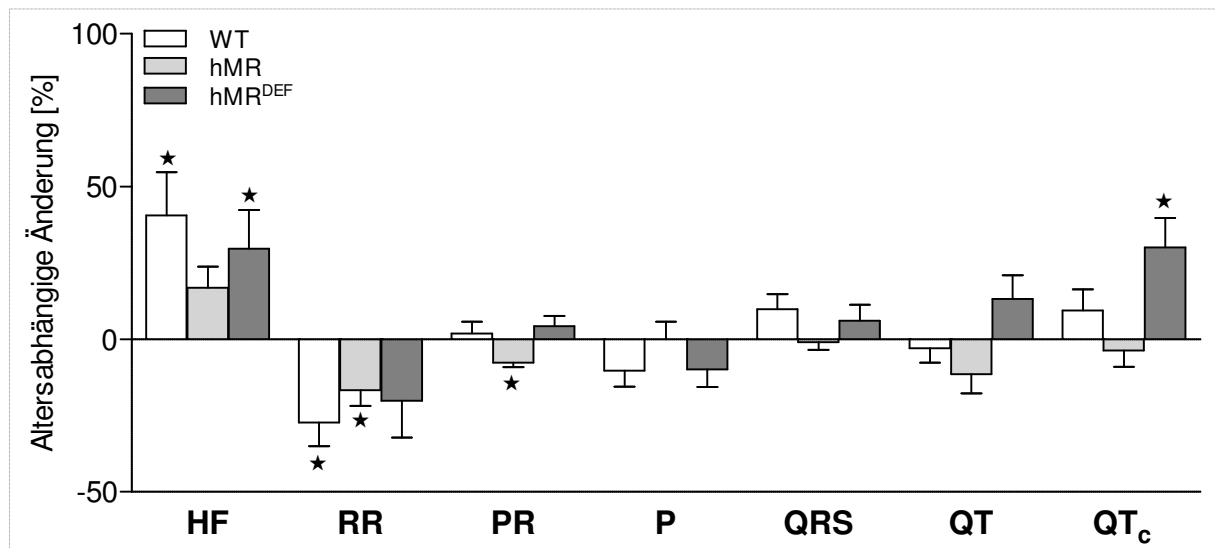


Abb. 23: Ergebnisse der altersabhängigen elektrokardiographischen Untersuchung. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung zwischen sechs und zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Mäusen. * $p < 0,05$ gegenüber der sechs Monate alten Kontrolle, $n = 6$ bis 9 pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Abstand zwischen zwei Herzschlägen (RR), Dauer der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (PR), Dauer der intraatrialen (P) und der intraventrikulären Erregungsausbreitung (QRS), Dauer der gesamten intraventrikulären Erregung (QT, frequenzkorrigiert = QT_c).

Da die untersuchten Mäuse unter der Narkose jedoch eine deutlich niedrigere Herzfrequenz als nicht-narkotisierte Mäuse (sechs Monate alte FVB/N-Mäuse: 770 bis 780 bpm, zwölf Monate alte FVB/N-Mäuse: 707 bis 714 bpm (Xing et al. 2009)) aufwiesen, wurde im weiteren Verlauf der kardialen Untersuchung durch β -Adrenozeptor-Stimulation die Herzfrequenz auf nahezu physiologische Werte gebracht und die Tiere erneut untersucht. Den narkotisierten Tieren wurde hierfür einmalig das β -selektive Sympathomimetikum Isoprenalin (ISO, 1mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die EKG-Auswertung unter β -Adrenozeptor-Stimulation erfolgte dabei im Maximum der ISO-Wirkung (maximale Herzfrequenz).

Bei den sechs Monate alten α MHC hMR-Tieren zeigte sich unter β -Adrenozeptor-Stimulation im Vergleich zu den WT-Mäusen ein verlängertes QT- sowie QT_c-Intervall (Tab. 6). Die α MHC hMR^{DEF}-Mäuse dieser Altersgruppe wiesen nach der i.p. Injektion von ISO keine Unterschiede zum WT-EKG auf (Tab. 6).

Unter der β -Adrenozeptor-Stimulation traten bei den zwölf Monate alten α MHC hMR-Tieren im Vergleich zu den WT-Mäusen eine erhöhte Herzfrequenz sowie ein verkürzter QRS-Komplex auf, wie Tabelle 6 zeigt. Bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen konnten nach der i.p. Injektion von ISO ein verlängertes QT- sowie QT_c-Intervall beobachtet werden (Tab. 6).

	Sechs Monate			Zwölf Monate		
	WT	hMR	hMR ^{DEF}	WT	hMR	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	505,2 ± 19,5	482,2 ± 15,1	510,1 ± 17,1	511,3 ± 19,3	564,7 ± 14,4 [#]	514,9 ± 18,6
RR-Intervall (ms)	120,3 ± 4,5	125,0 ± 4,2	118,8 ± 3,9	118,7 ± 4,6	106,6 ± 2,6 [#]	118,1 ± 5,4
PR-Intervall (ms)	34,0 ± 2,3	35,1 ± 1,2	33,4 ± 1,5	34,0 ± 1,5	31,5 ± 1,0	32,7 ± 1,2
P-Welle (ms)	12,4 ± 0,7	12,8 ± 0,4	11,8 ± 0,5	11,8 ± 0,8	10,0 ± 0,4	11,8 ± 0,5
QRS-Komplex (ms)	13,3 ± 1,1	13,9 ± 0,9	14,9 ± 1,1	15,4 ± 0,7	13,2 ± 0,5 [#]	16,2 ± 0,7
QT-Intervall (ms)	28,4 ± 1,4	34,3 ± 2,6 [*]	26,1 ± 2,0	26,4 ± 1,4	27,0 ± 1,2	30,7 ± 1,9 [#]
QT _c -Intervall (ms)	81,9 ± 3,6	96,9 ± 6,3 [*]	75,4 ± 5,1	80,6 ± 3,1	82,3 ± 3,4	89,3 ± 4,9 [#]

Tab. 6: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung unter β -Adrenozeptor-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der EKG-Aufzeichnungen von sechs und zwölf Monaten alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren im Maximum der β -Adrenozeptor-Stimulation. * $p < 0,05$ gegenüber WT_{ISO} mit sechs Monaten, [#] $p < 0,05$ gegenüber WT_{ISO} mit zwölf Monaten, $n = 6$ bis 9 .

Bei den sechs Monate alten Mäusen stieg die Herzfrequenz im EKG nach ISO i.p.-Injektion etwa gleich stark an, ebenso wie das QT_c-Intervall. Außerdem war in dieser Altersgruppe bei den WT- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren unter der β -Adrenozeptor-Stimulation eine verkürzte intraatriale Erregungsausbreitung zu beobachten (Abb. 24).

In der Gruppe der zwölf Monate alten Tieren stieg die Herzfrequenz im EKG nach ISO i.p.-Injektion zwar unterschiedlich stark an, eine Reaktion auf die β -Adrenozeptor-Stimulation konnte jedoch bei allen drei Genotypen belegt. Für WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Mäuse war außerdem ein Anstieg des QT_c-Intervalls zu beobachten. Daneben trat bei den zwölf Monate alten α MHC hMR-Tieren eine Abnahme der intraatrialen Erregungsausbreitung und der gesamten intraventrikulären Erregungsdauer auf. Nach ISO i.p.-Injektion zeigte sich bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen mit zwölf Monaten eine verkürzte atrioventikuläre Erregungsüberleitung. Außerdem stieg die gesamte intraventrikuläre Erregungsdauer unter der β -Adrenozeptor-Stimulation bei diesen Mäusen eher an, während sie bei WT- und α MHC hMR-Tieren eher abnahm, wie Abbildung 24 zeigt.

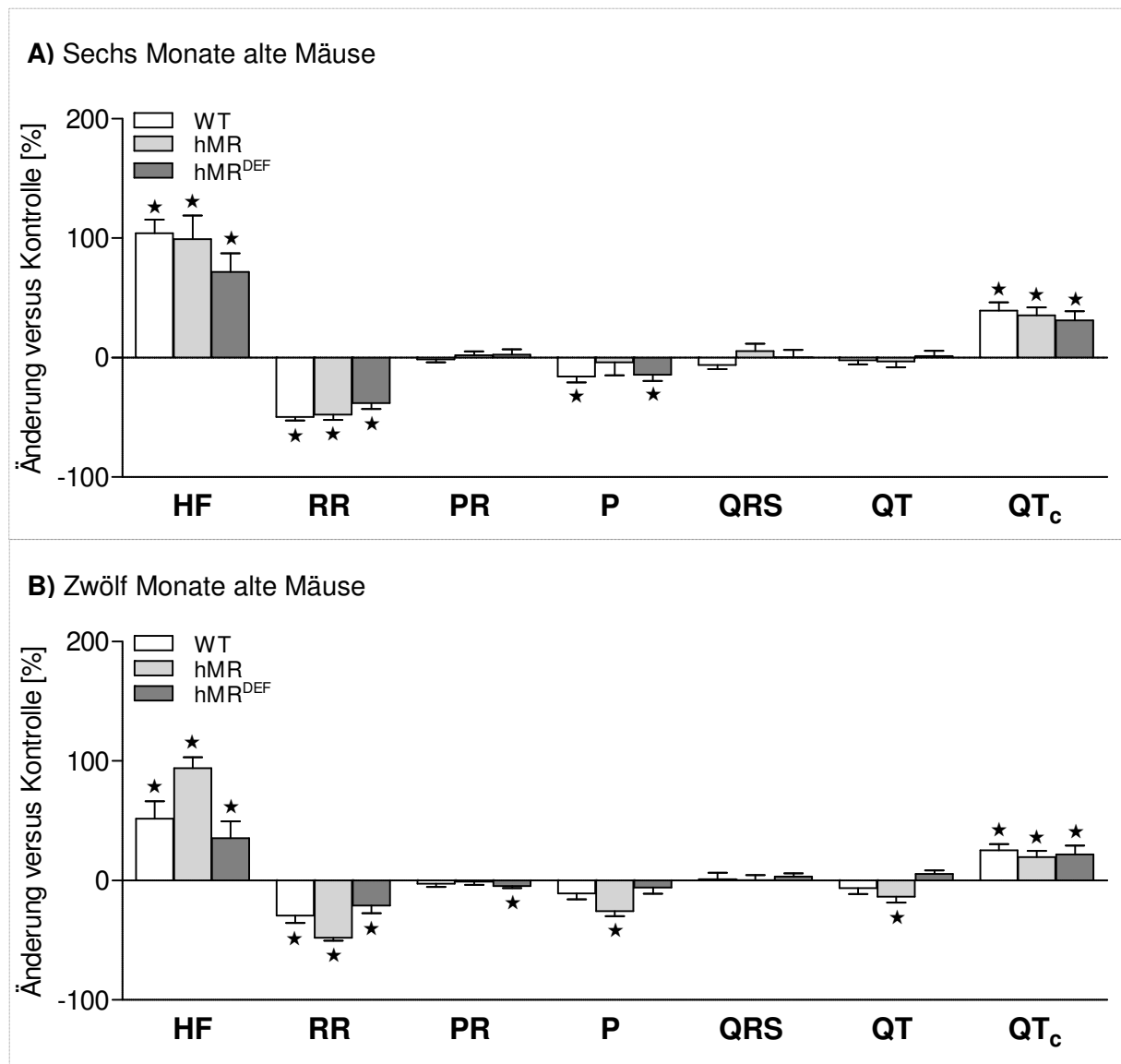


Abb. 24: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung unter β -Adrenozeptor-Stimulation. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung bei sechs (A) und zwölf (B) Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren im Maximum der β -Adrenozeptor-Stimulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. * $p < 0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle, $n = 6$ bis 9 pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Abstand zwischen zwei Herzschlägen (RR), Dauer der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (PR), Dauer der intraatrialen (P) und der intraventrikulären Erregungsausbreitung (QRS), Dauer der gesamten intraventrikulären Erregung (QT, frequenzkorrigiert = QT_c).

4.2.5 Echokardiographische Untersuchung

Zur Analyse des Einflusses von hMR- bzw. hMR^{DEF} auf die linksventrikulären Herzfunktion sowie die kardialen Dimensionen, wurden transgene und WT-Mäuse mittels Echokardiographie untersucht.

Die sechs Monate alten α MHC hMR-Mäuse wiesen neben einer erhöhten Herzfrequenz keine weiteren Unterschiede gegenüber den WT-Tieren auf (Tab. 7). Zwischen den α MHC hMR^{DEF}-Tieren im Alter von sechs Monaten und den WT-Mäusen dieser Altersgruppe konnten keine Unterschiede bei der echokardiographischen Untersuchung festgestellt werden (Tab. 7).

Die zwölf Monate alten α MHC hMR-Mäuse wiesen im Vergleich zu den WT-Tieren eine verminderte diastolische Septumdicke sowie eine reduzierte diastolische und systolische Hinterwanddicke auf. Funktionell ließen sich jedoch keine Unterschiede gegenüber den WT-Mäusen feststellen (Tab. 7). Bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen war ebenfalls eine verminderte diastolische Septumdicke im Vergleich zu den WT-Tieren dieser Altersgruppe zu beobachten. Funktionelle Unterschiede des linken Ventrikels traten im Vergleich zu den WT-Mäusen ebenfalls nicht auf (Tab. 7).

	Sechs Monate			Zwölf Monate		
	WT	hMR	hMR ^{DEF}	WT	hMR	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	219,3 ± 9,2	263,8 ± 16,0*	233,4 ± 16,3	282,6 ± 24,9	287,3 ± 30,8	265,2 ± 25,2
Herzzeitvolumen (ml/min)	5,7 ± 0,3	6,6 ± 0,5	6,2 ± 0,6	5,8 ± 0,9	5,7 ± 0,7	5,5 ± 0,6
Schlagvolumen (μl)	25,3 ± 1,7	25,0 ± 1,3	27,0 ± 2,9	22,4 ± 3,1	20,1 ± 2,6	20,9 ± 1,5
Enddiastolisches Volumen (μl)	39,6 ± 2,6	42,0 ± 3,3	44,4 ± 3,2	31,8 ± 4,8	29,2 ± 3,6	29,8 ± 2,3
Endsystolisches Volumen (μl)	14,3 ± 1,2	17,1 ± 3,1	17,4 ± 1,4	9,4 ± 2,1	9,1 ± 2,0	8,8 ± 1,4
Ejektionsfraktion (%)	64,1 ± 1,8	60,6 ± 4,6	60,1 ± 3,1	72,7 ± 3,3	69,5 ± 5,0	71,3 ± 3,4
Verkürzungsvermögen (%)	33,9 ± 1,3	31,7 ± 3,1	31,5 ± 2,2	41,1 ± 2,9	39,6 ± 4,0	40,0 ± 3,2
Enddiastolischer Kammerdurchmesser (mm)	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,1	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Endsystolischer Kammerdurchmesser (mm)	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,2	2,3 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1
Diastolische Septumdicke (mm)	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1 [#]	1,2 ± 0,1 [#]
Systolische Septumdicke (mm)	1,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Diastolische Hinterwanddicke (mm)	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,1 [#]	1,4 ± 0,1
Systolische Hinterwanddicke (mm)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1 [#]	1,7 ± 0,1

Tab 7: Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der linksventrikulären Herzfunktion von sechs und zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren. *p < 0,05 gegenüber WT mit sechs Monaten, [#]p < 0,05 gegenüber WT mit zwölf Monaten, n = 5 bis 9.

Die altersabhängige echokardiographische Untersuchung der WT-Mäuse ergab, neben einer erhöhten Herzfrequenz, den Anstieg von Ejektionsfraktion und Verkürzungsvermögen des linken Ventrikels. Außerdem war eine Zunahme der myokardialen Wanddicke zu beobachten, wobei sowohl das endsystolische Volumen als auch der endsystolische Kammerdurchmesser abnahmen (Abb. 25). Bei den α MHC hMR-Tieren nahmen altersabhängig das enddiastolische und endsystolische Volumen sowie der enddiastolische und endsystolische Kammerdurchmesser ab (Abb. 25). Die α MHC hMR^{DEF}-Mäuse zeigten altersabhängig neben einem reduzierten enddiastolischen und endsystolischen Volumen sowie einem verminderten enddiastolischen und endsystolischen Kammerdurchmesser auch eine Abnahme des Schlagvolumens. Die myokardiale Hinterwanddicke nahm altersabhängig sowohl diastolisch als auch systolisch zu, wie Abbildung 25 zeigt.

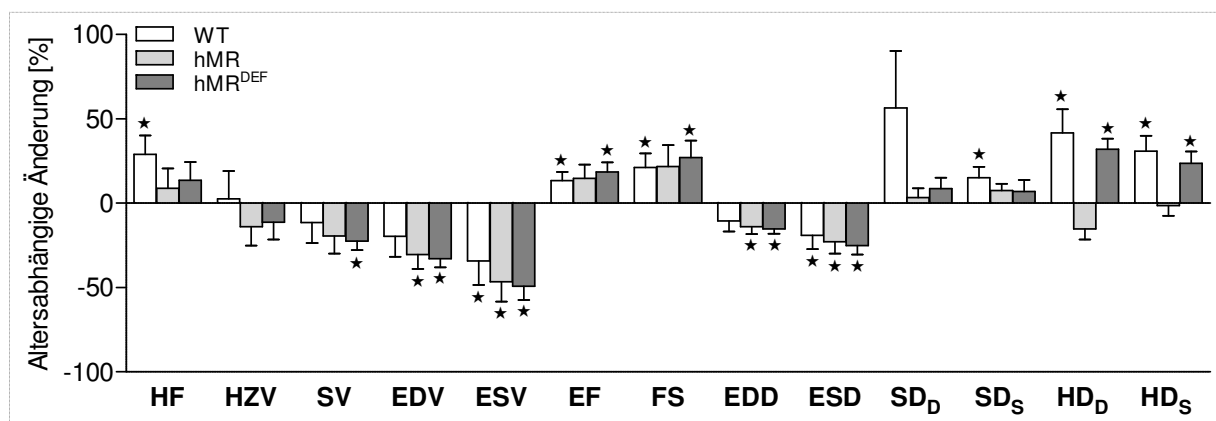


Abb. 25: Ergebnisse der altersabhängigen echokardiographischen Untersuchung. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung zwischen sechs und zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Mäusen. * $p < 0,05$ gegenüber der sechs Monate alten Kontrolle, $n = 5$ bis 9 pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Herzzeitvolumen (HZV), Schlagvolumen (SV), endsystolisches und enddiastolisches Volumen (ESV, EDV), Ejektionsfraktion (EF), Verkürzungsvermögen (FS), enddiastolischer und endsystolischer Kammerdurchmesser (EDD, ESD), diastolische und systolische Septumdicke (SD_D, SD_S), diastolische und systolische Hinterwanddicke (HD_D, HD_S).

Die Untersuchung der linksventrikulären Herzfunktion sowie der kardialen Dimensionen mittels Echokardiographie bei annähernd physiologischer Herzfrequenz erfolgte nach i.p.-Injektion im Maximum der ISO-Wirkung (maximale Herzfrequenz).

Nach der ISO-Injektion war in der Gruppe der sechs Monate alten Tiere kein Unterschied im Vergleich zu den WT-Mäusen zu beobachten (Tab. 8).

Unter der β -Adrenozeptor-Stimulation traten bei den zwölf Monate alten α MHC hMR-Tieren während der echokardiographischen Untersuchung keine Unterschiede im Vergleich zu den

WT-Mäusen auf (Tab. 8). Bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen zeigten sich nach der ISO-Injektion gegenüber den WT-Tieren neben einer verminderten diastolischen Septumdicke und einer reduzierten diastolischen Hinterwanddicke keine weiteren Unterschiede (Tab. 8).

	Sechs Monate			Zwölf Monate		
	WT	hMR	hMR ^{DEF}	WT	hMR	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	475,8 ± 22,5	483,6 ± 36,8	480,2 ± 37,2	452,8 ± 19,5	444,7 ± 39,9	437,9 ± 25,4
Herzzeitvolumen (ml/min)	7,4 ± 0,9	9,3 ± 1,6	9,4 ± 1,4	6,8 ± 1,1	6,4 ± 1,1	8,2 ± 1,4
Schlagvolumen (µl)	16,2 ± 2,4	18,8 ± 2,4	19,00 ± 1,8	13,9 ± 2,0	14,3 ± 2,3	18,1 ± 2,4
Enddiastolisches Volumen (µl)	18,0 ± 2,7	19,4 ± 2,3	20,8 ± 2,0	14,6 ± 2,0	15,2 ± 2,7	18,7 ± 2,4
Endsystolisches Volumen (µl)	1,8 ± 0,8	0,6 ± 0,1	1,8 ± 0,4	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,5	0,6 ± 0,1
Ejektionsfraktion (%)	90,8 ± 3,4	96,6 ± 0,6	92,1 ± 1,8	94,4 ± 1,7	95,2 ± 1,8	96,4 ± 0,8
Verkürzungsvermögen (%)	63,6 ± 4,7	72,7 ± 1,8	63,1 ± 3,2	68,9 ± 3,6	69,9 ± 3,9	72,8 ± 2,1
Enddiastolischer Kammerdurchmesser (mm)	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,1
Endsystolischer Kammerdurchmesser (mm)	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Diastolische Septumdicke (mm)	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,2	1,3 ± 0,1 [#]
Systolische Septumdicke (mm)	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1
Diastolische Hinterwanddicke (mm)	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,1 [#]
Systolische Hinterwanddicke (mm)	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Tab 8: Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung unter β -Adrenozeptor-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der linksventrikulären Herzfunktion von sechs und zwölf Monaten alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren im Maximum der β -Adrenozeptor-Stimulation. $p > 0,05$ gegenüber WT_{ISO} mit sechs Monaten, [#] $p < 0,05$ gegenüber WT_{ISO} mit zwölf Monaten, $n = 5$ bis 9 .

Die Reaktion auf die β -Adrenozeptor-Stimulation war dabei bei beiden Altersgruppen aller drei Genotypen gleichsinnig, wie Abbildung 26 zeigt.

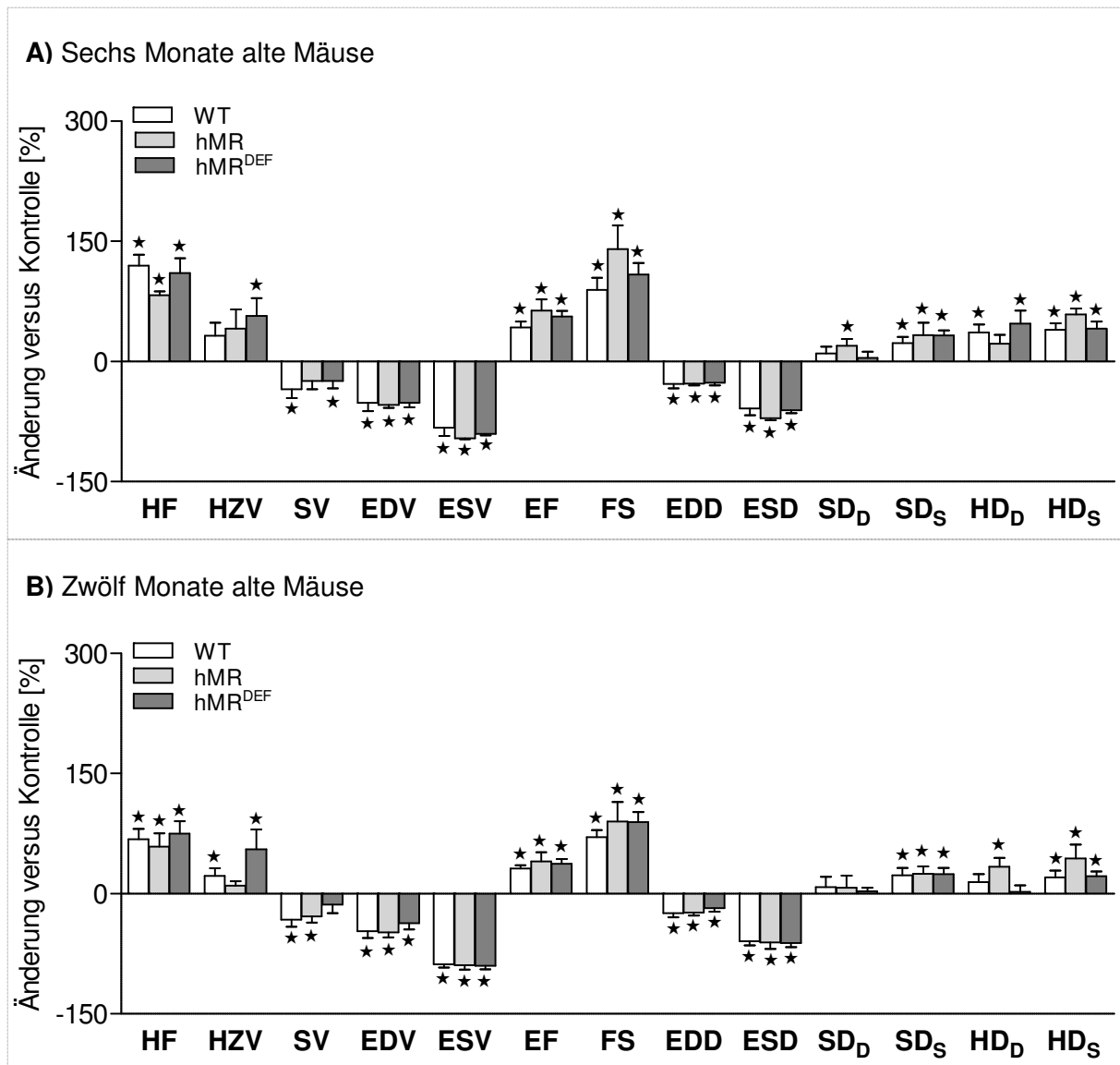


Abb. 26: Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung unter β -Adrenozeptor-Stimulation. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung bei sechs (A) und zwölf (B) Monate alten WT-, α MHC hMR- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren im Maximum der β -Adrenozeptor-Stimulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. * $p < 0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle, $n = 5$ bis 9 pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Herzzeitvolumen (HZV), Schlagvolumen (SV), endsystolisches und enddiastolisches Volumen (ESV, EDV), Ejektionsfraktion (EF), Verkürzungsvermögen (FS), enddiastolischer und endsystolischer Kammerdurchmesser (EDD, ESD), diastolische und systolische Septumdicke (SD_D, SD_S), diastolische und systolische Hinterwanddicke (HD_D, HD_S).

4.3 Pathologische hMR^{DEF} -Aktivierung durch Aldosteron und Natriumchlorid

Für die pathologische hMR^{DEF} -Aktivierung durch Aldosteron (Aldo) und Natriumchlorid (NaCl) wurden fünf Monate alte WT- und αMHC hMR^{DEF} -Tieren Aldo-freisetzende Pellets (0,75 $\mu g/h$) subkutan implantiert und diesen Mäusen über einen Zeitraum von vier Wochen 1% NaCl oral mit dem Trinkwasser zugeführt (Aldo+NaCl). Die Kontrollgruppen erhielten weder Aldo-freisetzende Pellets noch NaCl (WT/Kontrolle, hMR^{DEF} /Kontrolle). Die Untersuchungen erfolgten vier Wochen nach Pelletimplantation an den somit sechs Monate alten Tieren.

4.3.1 Morphologische Parameter bei pathologischer hMR^{DEF} -Aktivierung

Die Auswirkung der Aldo/NaCl-Behandlung auf die myokardiale Masse wurde anhand des Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht (relatives Herzgewicht) bestimmt. Gegenüber der jeweiligen Kontrolle zeigte sich bei den behandelten Tieren keine Veränderungen im relativen Herzgewicht (Abb. 27). Zwischen den behandelten Gruppen waren ebenfalls keine Unterschiede zu beobachten (Tab. 9).

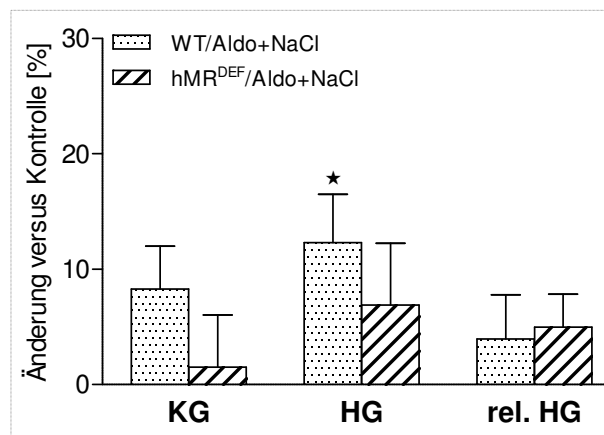


Abb. 27: Morphologischen Parameter bei pathologischer hMR^{DEF} -Aktivierung. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung bei WT- und αMHC hMR^{DEF} -Tieren nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. * $p < 0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle, $n = 8$ pro Gruppe.

	Aldo+NaCl	
	WT	hMR ^{DEF}
Körpergewicht (g)	29,4 ± 1,0	29,5 ± 1,3
Herzgewicht (mg)	127,7 ± 4,7	133,0 ± 6,6
Relatives Herzgewicht (mg/g)	4,4 ± 0,2	4,5 ± 0,1

Tab. 9: Morphologische Parameter bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von WT- und αMHC hMR^{DEF}-Tieren nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl. $p > 0,05$ gegenüber WT/Aldo+NaCl, $n = 8$.

4.3.2 Kardiale Transkription bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung

Um die Transkription des hMR^{DEF} unter Aldo und NaCl zu untersuchen, wurde die Auswirkung dieser Behandlung auf die kardiale mRNA-Expression des *eGFP* mittels qPCR analysiert.

Dabei zeigte sich bei den mit Aldo und NaCl behandelten αMHC hMR^{DEF}-Mäusen ein niedrigerer Schwellenwert (ΔCt , Tab. 10) des an den hMR^{DEF} gekoppelten *eGFP* gegenüber den Kontrolltieren ($\Delta\text{Ct} = 6,6 \pm 0,4$). Unter der Aldo/NaCl-Behandlung wurde somit etwa halb so viel hMR^{DEF}-mRNA (-1,9-fach) als bei den unbehandelten Tieren (hMR^{DEF}/Kontrolle) exprimiert.

	Kontrolle	Aldo+NaCl
$\Delta\text{Ct } eGFP$	6,6 ± 0,4	7,5 ± 0,2

Tab. 10: Ergebnisse der kardialen mRNA-Expression für *eGFP* bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Dargestellt sind die ΔCt -Mittelwert ± SEM der *eGFP*-mRNA-Expression von αMHC hMR^{DEF}-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl. $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle, $n = 8$.

Gegenüber der Kontrolle zeigte sich bei den WT/Aldo+NaCl-Tieren kaum eine Veränderung der *Nr3c2*-Transkription. Die *Nr3c2*-mRNA-Menge der behandelten αMHC hMR^{DEF}-Mäuse dagegen war gegenüber der Kontrolle vermindert, wie in Abbildung 28 dargestellt.

Unter der Aldo/NaCl-Behandlung war bei den WT-Tieren eine gesteigerte mRNA-Expression von *Nppb*, βMHC und *Col1a1* gegenüber der WT/Kontrolle zu beobachten. Die mRNA-Mengen aller weiteren untersuchten Gene stiegen dabei kaum an (Abb. 28).

Die mRNA-Expression von αMHC, βMHC, *Fn1*, *Kcnh2* und *Cacna1c* der behandelten αMHC hMR^{DEF}-Tiere war gegenüber der hMR^{DEF}/Kontrolle vermindert. Die kardiale Transkription der

weiterhin untersuchen Gene zeigte dabei unter der Aldo/NaCl-Behandlung kaum eine Veränderung (Abb. 28).

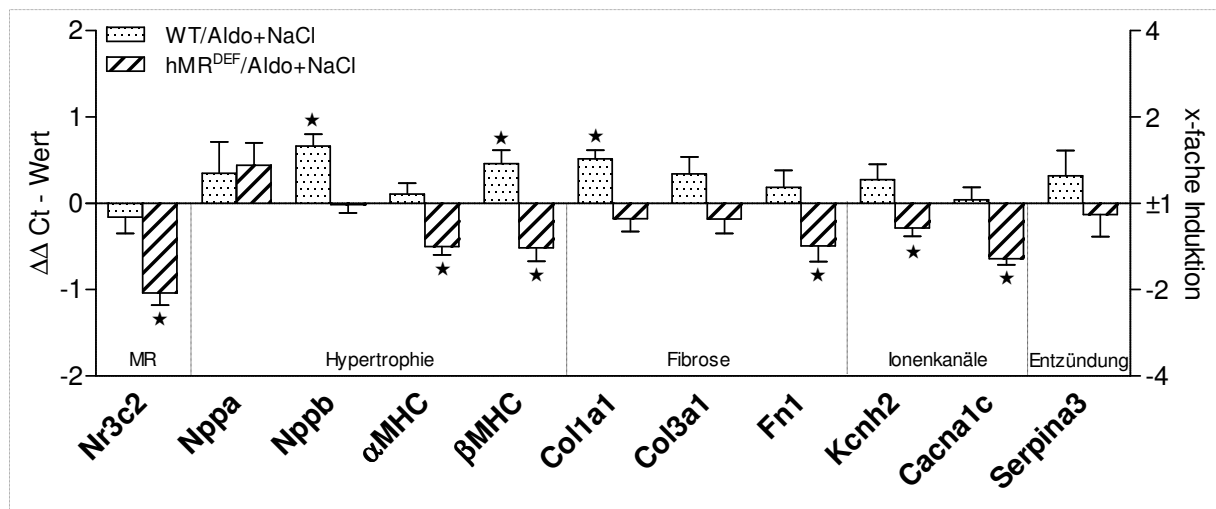


Abb. 28: Ergebnisse der kardiale mRNA-Expression bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta Ct$, x-fache Induktion) bei WT- und α MHC hMR^{DEF}-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. * $p < 0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle, $n = 8$ pro Gruppe.

Endogener MR (*Nr3c2*), natriuretisches Peptid Typ A und B (*Nppa*, *Nppb*), Myosinisoform α und β (α MHC, β MHC), α 1-Untereinheit des Kollagens vom Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col3a1*), Fibronectin 1 (*Fn1*), α -Untereinheit des hERG-Kaliumkanals (*Kcnh2*), α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*), Serinpeptidase Inhibitor/Akut-Phase-Protein (*Serpina3*).

In Abbildung 29 ist die kardiale mRNA-Expression der untersuchten Gene der behandelten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse im Vergleich zu den WT/Aldo+NaCl-Tieren dargestellt. Dabei fielen die etwa gleich großen Mengen an *Nr3c2*-mRNA auf. Die Transkription von *Nppa* und *Nppb* war bei den α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Mäusen gegenüber den behandelten WT-Tieren erhöht, die mRNA-Expression von α MHC sowie von *Kcnh2* dagegen vermindert (Abb. 29).

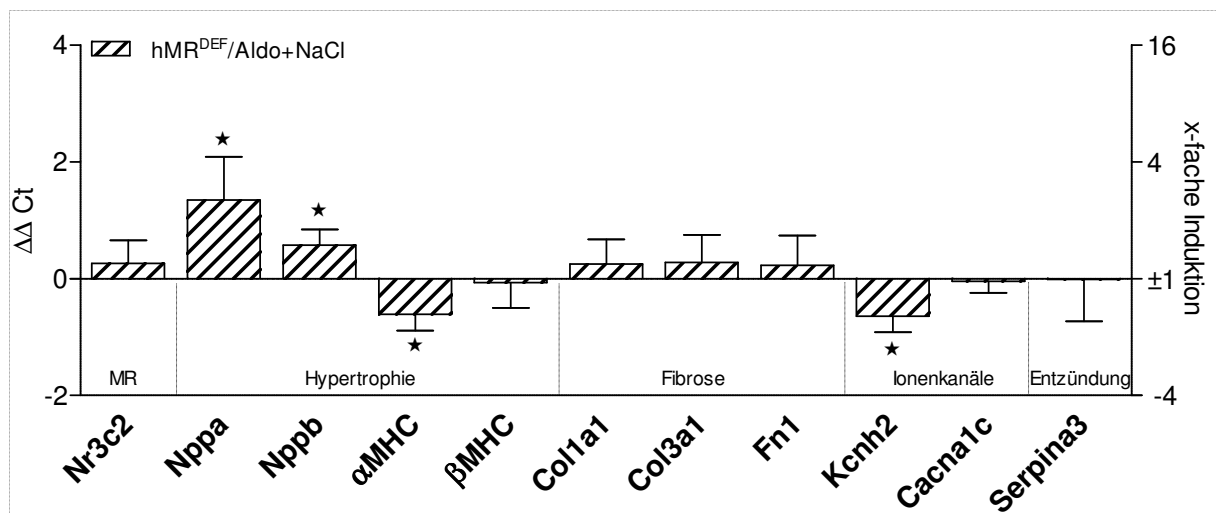


Abb. 29: Ergebnisse der kardialen mRNA-Expression bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Graphische Darstellung der Mittelwerte ± SEM der relativen mRNA-Expression (ΔΔCt, x-fache Induktion) von αMHC hMR^{DEF}-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl im Vergleich zu WT/Aldo+NaCl. *p < 0,05 gegenüber WT/Aldo+NaCl, n = 8 pro Gruppe.

Endogener MR (*Nr3c2*), natriuretisches Peptid Typ A und B (*Nppa*, *Nppb*), Myosinisoform α und β (αMHC, βMHC), α1-Untereinheit des Kollagens vom Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col3a1*), Fibronectin 1 (*Fn1*), α-Untereinheit des hERG-Kaliumkanals (*Kcnh2*), α-Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*), Serinpeptidase Inhibitor/Akut-Phase-Protein (*Serpina3*).

4.3.4 Elektrokardiographie bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung

Die Untersuchung der kardialen Erregungsleitung unter der Aldo/NaCl-Behandlung mittels Elektrokardiographie vier Wochen nach der Implantation der Aldo-freisetzenden Pellets ergab, dass gegenüber den unbehandelten WT-Tieren die Herzfrequenz der WT/Aldo+NaCl-Mäuse vermindert, entsprechend das RR-Intervall erhöht war. Bei den αMHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tieren zeigte sich im Vergleich zu den αMHC hMR^{DEF}/Kontrolltieren eine Zunahme der intraventrikulären Erregungsausbreitung (QRS-Komplex) und der gesamten intraventrikulären Erregungsdauer (QT-Intervall) (Abb. 30).

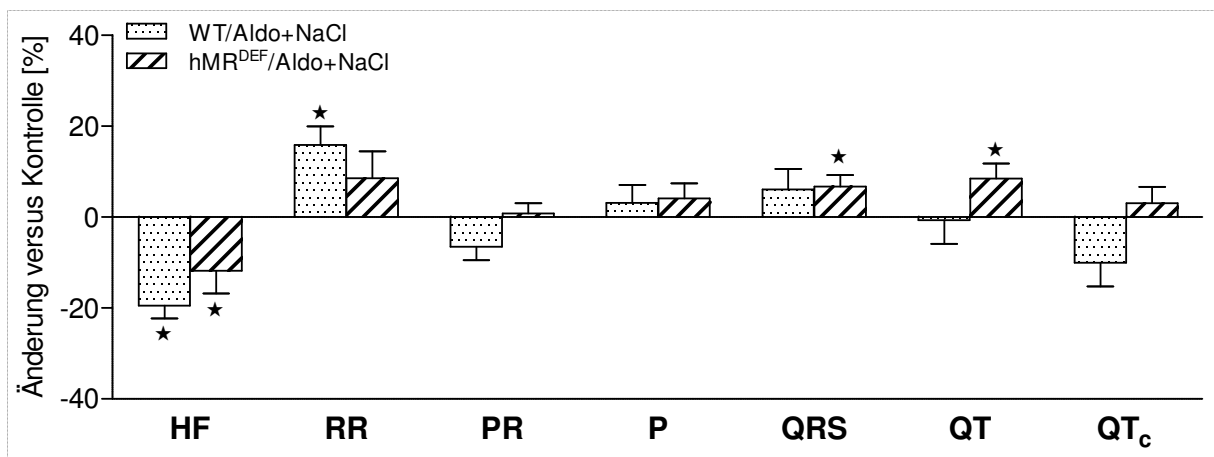


Abb. 30: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung bei WT- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. *p < 0,05 gegenüber der unbehandelten Kontrolle, n = 8 pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Abstand zwischen zwei Herzschlägen (RR), Dauer der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (PR), Dauer der intraatrialen (P) und der intraventrikulären Erregungsausbreitung (QRS), Dauer der gesamten intraventrikulären Erregung (QT, frequenzkorrigiert = QT_c).

Zwischen den behandelten Gruppen zeigte sich für die α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Mäuse im EKG gegenüber den behandelten WT-Tieren eine erhöhte Herzfrequenz sowie ein verkürztes RR-Intervall. Daneben fiel bei den behandelten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen ein verlängertes QT_c-Intervall im Vergleich zu den WT/Aldo+NaCl-Tieren auf (Tab. 11).

	Aldo + NaCl	
	WT	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	216,2 \pm 7,6	247,9 \pm 14,0*
RR-Intervall (ms)	280,0 \pm 9,7	247,4 \pm 13,4*
PR-Intervall (ms)	32,8 \pm 1,0	33,5 \pm 0,7
P-Welle (ms)	14,8 \pm 0,6	16,0 \pm 0,5
QRS-Komplex (ms)	14,1 \pm 0,6	14,4 \pm 0,3
QT-Intervall (ms)	28,6 \pm 1,5	30,4 \pm 0,9
QT _c -Intervall (ms)	54,2 \pm 3,1	61,5 \pm 2,1*

Tab. 11: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von WT- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl. *p < 0,05 gegenüber WT/Aldo+NaCl, n = 8.

4.3.4 Echokardiographie bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung

Gegenüber der WT/Kontrolle zeigte sich für die WT-Tiere unter Aldo und NaCl eine Abnahme der Herzfrequenz, des Herzzeitvolumens, der Ejektionsfraktion und des kardialen Verkürzungsvermögens, wobei der endsystolische Kammerdurchmesser vergrößert war. (Abb. 31). Die α MHC hMR^{DEF}-Tiere wiesen unter der Aldo/NaCl-Behandlung keine Veränderung im Vergleich zur hMR^{DEF}/Kontrolle auf (Abb. 31).

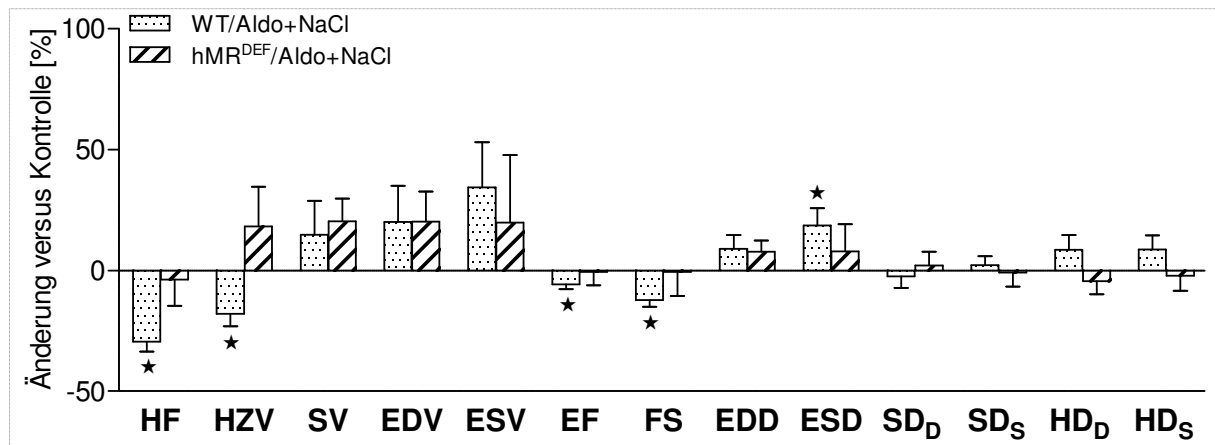


Abb. 31: Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung bei WT- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. * $p < 0,05$ gegenüber der unbehandelten Kontrolle, $n = 8$ pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Herzzeitvolumen (HZV), Schlagvolumen (SV), endsystolisches und enddiastolisches Volumen (ESV, EDV), Ejektionsfraktion (EF), Verkürzungsvermögen (FS), enddiastolischer und endsystolischer Kammerdurchmesser (EDD, ESD), diastolische und systolische Septumdicke (SD_D, SD_S), diastolische und systolische Hinterwanddicke (HD_D, HD_S).

Bei der echokardiographischen Untersuchung unter der Aldo/NaCl-Behandlung vier Wochen nach der Pelletimplantation war zwischen den behandelten Gruppen lediglich ein erhöhtes Herzzeitvolumen der α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Gruppe im Vergleich zu den WT/Aldo+NaCl-Tieren erkennbar (Tab. 12).

	Aldo + NaCl	
	WT	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	247,0 ± 14,5	316,9 ± 35,7
Herzzeitvolumen (ml/min)	5,7 ± 0,4	8,3 ± 1,1*
Schlagvolumen (μl)	25,0 ± 3,0	26,5 ± 2,1
Enddiastolisches Volumen (μl)	35,7 ± 4,4	36,7 ± 3,8
Endsystolisches Volumen (μl)	10,7 ± 1,4	10,2 ± 2,4
Ejektionsfraktion (%)	70,6 ± 1,6	74,0 ± 4,1
Verkürzungsvermögen (%)	38,8 ± 1,2	43,3 ± 4,3
Enddiastolischer Kammerdurchmesser (mm)	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1
Endsystolischer Kammerdurchmesser (mm)	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,2
Diastolische Septumdicke (mm)	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Systolische Septumdicke (mm)	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1
Diastolische Hinterwanddicke (mm)	1,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Systolische Hinterwanddicke (mm)	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1

Tab. 12: Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von WT- und αMHC hMR^{DEF}-Tieren nach vierwöchiger Behandlung mit Aldo und NaCl. *p < 0,05 gegenüber WT/Aldo+NaCl, n = 8.

5. Diskussion

5.1 Generierung der transgenen α MHC hMR^{DEF}-Linie

Um die Pathomechanismen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung, im Besonderen einer Herzinsuffizienz, besser zu verstehen, ist es notwendig, mit dem Versuchsaufbau die *in vivo*-Situation möglichst exakt zu imitieren, d.h. es müssen ähnliche biologische, chemische und genetische Bedingungen geschaffen werden. Transgene Mausmodelle spielen daher eine immer wichtiger werdende Rolle in der medizinischen Forschung (Mitchell et al. 1998). Die hier verwendete Methode der Pronukleus-Injektion zur Generierung eines neuen Tiermodells ist Mittel der Wahl bei der Herstellung von transgenen Mäusen mit Überexpression bestimmter Gene (Gordon et al. 1980). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur Herstellung der transgenen Mauslinien der FVB/N-Mausstamm ausgewählt, da dieser Stamm die besten Voraussetzungen für die Generierung der transgenen Mäuse besitzt (Taketo et al. 1991).

Mittels Pronukleus-Injektion lassen sich zwar rasch und effektiv transgene Tiere herstellen, die Fremd-DNA wird aber nicht definiert sondern nur zufällig in das Genom integriert. Dies kann zu Dysregulation und Inaktivierung sowohl des Transgens als auch endogener Gene führen. Weiterhin kann nicht vorher gesagt werden, wie viele Kopien des Konstrukts in das Genom eingefügt werden und ob das transgene Tier dieses auch vererbt (Taketo et al. 1991). Daher wurde nach der Generierung der Mausmodelle zunächst eine Untersuchung der mRNA- und Protein-Expression der Konstrukte selbst durchgeführt.

Um die herzspezifische Expression des hMR bzw. des hMR^{DEF} erzielen zu können, wurden die Konstrukte in einen Expressionsvektor mit dem *α -myosin heavy chain* (α MHC) Promotor kloniert, welcher eine geringe Expression während der Embryonalentwicklung und eine starke postnatale Expression der von diesem Promotor kontrollierten Gene im Herzen gewährleistet (Gulick et al. 1999). Das als Marker verwendete grün fluoreszierende Protein (*enhanced green fluorescent protein, eGFP*) machte es dabei möglich, die Mauslinien einheitlich zu untersuchen, da aufgrund der fehlenden Domänen im hMR^{DEF}-Konstrukt unterschiedliche Antikörper oder Primer hätten verwendet werden müssen. So konnten die Nachweise gleichermaßen anhand der *eGFP*-Untersuchung durchgeführt werden. Auf die Generierung einer Mauslinie mit einer kardialen *eGFP*-Expression (Expression des *eGFP*-Leervektors) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet, da bereits belegt werden konnte, dass eine *eGFP*-Expression unauffällig ist (Okabe et al. 1997, Schaefer et al. 2001). Alle Untersuchungen erfolgten daher im Vergleich zu Wildtyptieren.

Mittels Genotypisierung konnte zwar die Anwesenheit des jeweiligen Konstrukts im Genom belegt werden, sie gab jedoch weder Auskunft über die Transkription noch über die Proteinbiosynthese. Daher wurde nach Identifizierung der transgenen Mäuse die kardiale

mRNA-Expression der transgenen Rezeptoren analysiert. Mittels reverser Transkriptase (RT)-PCR konnte sowohl in den α MHC hMR- als auch in den α MHC hMR^{DEF}-Herzen die mRNA des entsprechenden Konstrukts nachgewiesen werden. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass diese Gene Transkriptionsprozessen unterlagen und funktionstüchtig waren.

Anschließend wurde untersucht, ob eine Proteinbiosynthese der transgenen Rezeptoren stattfand. Bei Fixierung des Herzgewebes in 4% Formalin direkt nach der Organentnahme konnte die Proteinexpression des hMR mittels immunhistochemischer Färbung belegt werden (Abb. 13). Mit Hilfe der Western Blot-Technik war das hMR-Protein dagegen nicht nachweisbar, was vermutlich auf einen schnellen intrazellulären Abbau (Ouvrard-Pascaud et al. 2005) oder auf Schwierigkeiten mit dem primären Antikörper zurückzuführen ist. Aufgrund des positiven Nachweises des hMR mittels RT-PCR und Immunhistochemie konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass sowohl Transkription als auch Translation bei den hMR-Mäusen stattfanden.

Die Proteinexpression des hMR^{DEF} konnte sowohl immunhistochemisch als auch anhand der Western Blot-Technik spezifisch im Herzen der transgenen Mäuse nachgewiesen werden, was auf einen langsameren Abbau dieser Rezeptor-Variante zurückzuführen sein könnte. Somit konnte auch beim hMR^{DEF} davon ausgegangen werden, dass sowohl Transkription als auch Translation stattfanden. Des Weiteren konnte bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen eine isolierte kardiale Proteinexpression belegt werden. Da für die Generierung der beiden Mauslinien dieselbe Methode angewendet wurde, konnte daher auch bei den α MHC hMR-Tieren von einer spezifischen kardialen Proteinexpression angenommen werden.

Die unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungsmuster für den hMR (Farbakkumodation im Zellkern) und den hMR^{DEF} (diffuse Färbung im Zytosol) lassen sich vermutlich durch eine Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren aufgrund des bei der Organentnahme freigesetzten Stresshormons Kortisol erklären. Der intakte MR wandert nach seiner Aktivierung in den Zellkern, um als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor über das *glucocorticoid responds element (GRE)* die Regulation bestimmter Zielgene zu steuern. Die trunkierte DEF-Form dagegen hat durch Entfernung der DNA-Bindedomäne die Fähigkeit verloren, in den Zellkern zu wandern (Grossmann et al. 2008) und verbleibt daher nach seiner Aktivierung im Zytosol. Die Aktivierung kann sowohl durch den endogenen Liganden Aldosteron als auch durch Kortisol (Korticosteron bei Nagern) (Nishi and Kawata 2007) erfolgen. Stärkster Stimulus für die Ausschüttung von Kortisol ist Stress (Johnson et al. 1992), daher ist die Kortisolausschüttung u.a. bei einer psychischer Belastung (z. B. Angst) erhöht. Die Untersuchungen stellten für die Mäuse wahrscheinlich eine Stresssituation dar, wodurch die Plasmakonzentration des Kortisols vermutlich erhöht

war und somit die transgenen Rezeptoren während der Untersuchung bzw. perimortal durch das Glukokortikoid aktiviert worden sein könnten.

Auf den Nachweis der funktionstüchtigen Gene folgte die Etablierung der transgenen Mauslinien. Die Etablierung der α MHC hMR-Linie war dabei zunächst nicht erfolgreich, da alle transgenen Jungen des ersten Zuchtweibchens ab dem 10. Tag nach der Geburt (postnatal) verstarben, wobei keine phänotypischen Veränderungen festgestellt werden konnten. Die Letalität dieser transgenen Tiere könnte mit der Aktivität des kardialen α MHC-Promotors während der Kardiogenese erklärbar sein. Zwar sind beide Isoformen, α und β , bereits seit Beginn der kardialen Entwicklung vorhanden, während der Embryogenese und fetalen Entwicklung dominiert jedoch die β -Isoform (Ng et al. 1991). Etwa ab dem 16. Tag der embryonalen Entwicklung ist die α -Isoform minimal aktiv und detektierbar. Dessen Aktivität steigt weiter an, bis die α -Isoform ab dem 7. Tag p.p. schließlich die β -Isoform vollständig ersetzt (Lyons et al. 1991, Ng et al. 1991). Somit war der transgene hMR spätestens ab dem 7. Tag p.p. vollständig aktiv und verursachte vermutlich den Tod aller transgenen Jungen bis zum maximalen Alter von 14 Tagen.

Eine erhöhte Sterblichkeit von Mäusen mit kardialer hMR-Überexpression wurde bereits 2005 in der Arbeitsgruppe um Frédéric Jaisser in Paris beobachtet. Im Gegensatz zu den 2005 veröffentlichten Daten (Ouvrard-Pascaud et al. 2005), wurde jedoch keiner der in der vorliegenden Arbeit generierten α MHC hMR-Nachkommen aus diesem ersten Zuchtansatz älter als zwei Wochen. Dies ist vermutlich durch das in der vorliegenden Arbeit verwendete konstitutiv-aktive Modell zu erklären. Das französische Modell basierte dagegen auf einem induzierbaren (Tet-off) System, welches durch die Gabe eines Tetrazyklin-Analogons herunterreguliert werden konnte (Ouvrard-Pascaud et al. 2005).

Bei einem erneuten Zuchtansatz sollte den transgenen Tieren deshalb der MR-Inhibitor Kaliumcanrenoat verabreicht werden. Da für den hMR bereits eine intrauterine Letalität beschrieben worden war (Ouvrard-Pascaud et al. 2005) und während der ersten Zuchtphase keine α MHC hMR-Maus älter als zehn Tage wurde, musste die Inhibition somit so früh wie möglich erfolgen. Eine adäquate Behandlung der Nachkommen war vor der Entwöhnung von der Mutter (etwa an Tag 21 postnatal) jedoch nicht möglich, weil die Jungtiere bis zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich von der Mutter gesäugt wurden. Die MR-Inhibition bei den Jungtieren konnte daher nur indirekt über die Mutter erreicht werden. Das plazentagängige Kaliumcanrenoat wurde dem Zuchtweibchen daher bereits ab dem Zeitpunkt der Empfängnis mit dem Trinkwasser zugeführt. Somit konnte eine MR-Inhibition während der Embryonalentwicklung erreicht werden. Da nicht bekannt war, ob die Letalität nach Absetzen der MR-Inhibition wieder auftreten würde, wurde die MR-Blockierung bis einen Monat vor

den Untersuchungen fortgesetzt. Dabei überlebten alle transgenen Tiere die anschließenden vier Wochen bis zum Versuchszeitpunkt (Abb. 17).

Eine Etablierung der α MHC hMR-Linie über die F₂-Generation hinaus war jedoch nicht möglich. Die verminderte Fortpflanzungsrate dieser behandelten Tiere ist vermutlich durch eine Reproduktionstoxizität des unselektiven MR-Inhibitors Kaliumcanrenoat erklärbar, der durch seine ausgeprägten antiandrogenen Effekte vermutlich die Entwicklung und Funktion der Sexualorgane störte (Loriaux et al. 1976). Auch eine Verpaarung mit unbehandelten WT-Tieren brachte dabei keinen Zuchterfolg.

Die Etablierung der α MHC hMR^{DEF}-Linie verlief ohne Komplikationen und die Zucht konnte auf dem aus der einzigen Pronukleus-Injektion hervorgegangenen transgenen Weibchen aufgebaut werden. Auf die Gabe von Kaliumcanrenoat konnte bei dieser Linie daher verzichtet werden.

Da bei der α MHC hMR^{DEF}-Linie postnatal keine erhöhte Sterblichkeit auftrat, liegt somit die Vermutung nahe, dass nur der genomische hMR-Signalweg letal ist und somit bereits publizierte Daten bestätigt werden konnten (Ouvrard-Pascaud et al. 2005).

Somit standen nun zwei Mauslinien zur Verfügung, die es ermöglichten, die kardialen nichtgenomischen Effekte des Mineralokortikoidrezeptors *in vivo* zu untersuchen. Dabei zeigte eine nur genomisch-vermittelte Letalität.

5.2 Kardialer Phänotyp der sechs Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse

In epithelialen Geweben wie Niere, Darm und Speicheldrüsen ist der MR am Salz- und Wassertransport beteiligt und spielt somit bei der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle (Grossmann et al. 2008, Grossmann und Gekle 2009). Daneben wird er im kardiovaskulären System exprimiert. Hier führt eine MR-Aktivierung zu entzündlichen und proliferativen Prozessen (Jaffe et al. 2010, Johar et al. 2006, Newfell et al. 2011, Sun et al. 2002, Stas et al. 2007, Viridis et al. 2002) sowie veränderten kardialen Ionenströmen (Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Diese Effekte begünstigt pathophysiologische Mechanismen, wie z.B. Veränderungen in der kardialen Erregungsleitung und Fibrosierung (Bénitah et al. 2001, Lalevée et al. 2005, Nguyen Dinh Cat and Jaisser 2012), welche die Pathogenese einer Herzinsuffizienz fördern. Bisher ist jedoch nicht abschließend geklärt, welchen Anteil die genomischen Effekte an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen haben und welche Rolle der nichtgenomische Signalweg dabei spielt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch das neu etablierte Mausmodell zum ersten Mal der nichtgenomische Signalweg und seine kardialen Effekte *in vivo* getrennt vom genomischen Signalweg untersucht werden.

Die Charakterisierung des kardialen Phänotyps erfolgte zunächst an sechs Monate alten Mäuse, die dem menschlichen Alter von 20 bis 30 Jahren entsprechen (Flurkey et al. 2007). Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob der nichtgenomischen Signalweg bereits zu einem frühen Lebenszeitpunkt kardiale Dysfunktionen hervorrufen würde.

Um festzustellen, ob durch die Anwesenheit der transgenen Rezeptoren die grobe Morphologie des Herzens verändert wurde, erfolgte eine Untersuchung des relativen Herzgewichts. Hierfür wurden sowohl das Körpergewicht als auch das Herzgewicht der einzelnen Tiere bestimmt. Anhand der ermittelten Daten konnte der Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht (relatives Herzgewicht) berechnet werden, welcher zur Beurteilung der myokardiale Masse diente.

Bei den sechs Monate alten α MHC hMR-Tieren fiel dabei ein vergrößertes relatives Herzgewicht (Herzgewicht/Körpergewicht) gegenüber dem WT auf, welches aber vermutlich auf das tendenziell verminderte Körpergewicht ($p = 0,059$) zurückzuführen war (Tab. 3). Dies könnte dabei durch die Behandlung mit Kaliumcanrenoat und einer damit verbundenen verzögerten Entwicklung aufgrund der hormonellen Nebenwirkungen des MR-Inhibitors verursacht worden sein (Loriaux et al. 1976, Semler et al. 1989). Für die α MHC hMR^{DEF}-Tiere, die wie die WT-Mäuse kein Kaliumcanrenoat erhielten, waren keine Veränderungen des Körpergewichts oder des relativen Herzgewichts im Vergleich zu den WT-Mäusen zu beobachten.

Für die Untersuchung der α MHC-abhängigen kardialen Transkriptionsrate beider transgenen Rezeptoren, wurde jeweils die mRNA-Expression des gekoppelten *eGFP* herangezogen. Da beide hMR-Varianten das *eGFP* enthielten, ließen die ermittelten *eGFP*-mRNA-Mengen bei beiden Mauslinien Rückschlüsse auf die mRNA-Expression des entsprechenden Rezeptors zu. Es zeigte sich, dass bei den α MHC hMR-Mäusen die *eGFP*-mRNA deutlich später detektierbar war als bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen, woraus sich eine geringere mRNA-Menge für den transgenen hMR-Rezeptor ergab.

Da die transgenen Rezeptoren durch den α MHC-Promotor reguliert wurden, lag zunächst die Vermutung nahe, dass bei den α MHC hMR-Tieren die α MHC-Transkription Kaliumcanrenoat-abhängig verändert worden sein könnte. Die α MHC-mRNA-Expression wird u.a. durch das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T_3) reguliert (Morkin 2000), dessen Plasmaspiegel kann aufgrund endokriner Nebenwirkungen bei einer Therapie mit Spironolacton oder Kaliumcanrenoat vermindert sein (Loriaux et al. 1976, Semler et al. 1989). Somit hätte die intrauterine MR-Inhibition (s.o.) dauerhaft zu einer verminderten Transkription des α MHC-Promotors geführt haben können. Die Analyse von α MHC selbst (siehe unten) zeigte jedoch, dass bei den α MHC hMR-Mäusen mehr α MHC transkribiert

wurde als bei den α MHC hMR^{DEF}-Tieren (Abb. 21). Somit ist die Differenz der mRNA-Mengen zwischen den beiden transgenen Mausmodellen wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei der Pronukleus-Injektion zur Generierung der transgenen Tiere zufällig deutlich mehr hMR^{DEF}- als hMR-Konstrukt in das entsprechende Genom integriert worden war. Die zufällige Integration ist für diese Methode bereits beschrieben worden (Taketo et al. 1991).

Da die Anwesenheit der transgenen Rezeptoren die Transkription des endogenen MR (*Nr3c2*) beeinflusst haben konnte, wurde die *Nr3c2*-mRNA-Expression ebenfalls mittels qPCR untersucht. Bei den α MHC hMR-Mäusen wurde dabei eine negative Feedbackschleife zwischen transgenem und endogenem MR vermutet und somit eine verminderte Transkription des endogenen MR erwartet. Es zeigte sich jedoch eine höhere *Nr3c2*-mRNA-Menge im Vergleich zur WT-Kontrolle (1,7-fach, Abb. 19A). Dieses Ergebnis lässt sich vermutlich durch die Behandlung mit Kaliumcanrenoat erklären. Die intrauterine MR-Inhibition könnte dabei zu einer Kompensationsreaktion geführt haben, wobei der murine Organismus versucht haben könnte mittels gesteigerter *Nr3c2*-Transkription der Inhibition entgegen zu wirken.

Die Untersuchung der *Nr3c2*-Transkription bei den sechs Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tieren zeigte, dass die mRNA-Expression des endogenen MR ebenfalls etwa doppelt so hoch war wie bei den WT-Tieren (Faktor 2,2, Abb. 19A). Da diese Tiere nicht mit Kaliumcanrenoat behandelt wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Ergebnis um einen nichtgenomischen Effekt handelte. Möglicherweise hat der murine Organismus bei diesen Tieren durch die Erhöhung der *Nr3c2*-mRNA-Menge versucht, einen vergrößerten nichtgenomische MR-Einfluss zu kompensieren, um das kardiale Gleichgewicht zwischen nichtgenomischen und genomischen Effekten wieder herzustellen. Denkbar wäre jedoch auch, dass der hMR^{DEF} selbst über zytosolische Signalkaskaden, z.B. durch PKC Aktivierung, oder eine Interaktion mit dem EGF-Rezeptor (Grossmann et al. 2005, Grossmann and Gekle 2008, Grossmann et al. May 2010) die Transkription des endogenen MR gesteigert hat.

Diese Ergebnisse zeigten, dass bei beiden generierten transgenen Mauslinien die kardiale mRNA-Expression des endogenen MR beeinflusst wurde. Nachfolgende qPCR-Untersuchungen sollten klären, ob die Transkription weiterer Gene im Ventrikel der transgenen Tiere verändert war. Da eine MR-Aktivierung mit Hypertrophie, Fibrose, Remodeling, Entzündung und Veränderung der Ionenströme assoziiert ist, lag das Augenmerk vor allem auf Genen, deren veränderte Transkription bei Herzerkrankungen bzw. Herzinsuffizienz bereits beschrieben wurde (Blasi et al. 2003, Briet and Schiffrin 2010, Brilla

et al. 1994, Latouche et al. 2010, Ouvrard-Pascaud et al. 2005, Qin et al. 2003). Im Hinblick auf die Entstehung einer Hypertrophie waren dabei die Gene von Interesse, die für das atriale natriuretische Peptid ANP (natriuretische Peptid vom Typ A, *Nppa*) und das natriuretische Peptid vom Typ B BNP (*Nppb*), kodieren. Physiologisch erfolgt die Sekretion des vasodilatativen ANP bei Volumenanstieg vor allem aus den Vorhofkardiomyozyten (Potter et al. 2009, Yasue et al. 1994), BNP wird dabei hauptsächlich aus dem Ventrikelmyokard ausgeschüttet (Yasue et al. 1994). Bei chronisch erhöhter Volumenbelastung bzw. Herzinsuffizienz werden dann sowohl ANP als auch BNP von den Ventrikelkardiomyozyten sezerniert (Yasue et al. 1994). Während die ANP-Freisetzung im Verlauf der Dekompensation sinkt, wird BNP weiterhin ausgeschüttet. Seine Plasmakonzentration korreliert dabei mit dem Schweregrad der Erkrankung und dient somit im klinischen Alltag als diagnostischer bzw. prognostischer Marker („hoher negativ prädiktiver Wert“) und der Therapiekontrolle bei chronischer Herzinsuffizienz (Bhalla et al. 2004).

Die aufgrund einer Hypertrophie auftretende Kardiomyozytendehnung führt außerdem zu einer Verschiebung der Myosinisoformen. Dabei kommt es zur verstärkten Transkription der fetalen β -Isoform und zur verminderten Expression der adulten α -Isoform („fetales Genprogramm“) (Morkin 2000). Daher war die Transkription dieser beiden Gene für Beurteilung der möglichen hypertrophen Veränderungen im Herzen ebenfalls interessant. Die α MHC-mRNA-Expression wurde ebenfalls im Hinblick auf die Regulation von hMR und hMR^{DEF} untersucht, da die transgenen Rezeptoren an den α MHC-Promotor gekoppelt waren. Die extrazellulären Matrixmoleküle Kollagen Typ 1a1 (*Col1a1*) und Typ 3a1 (*Col3a1*) sind an der Herzarchitektur beteiligt und spielen eine wichtige Rolle bei der myokardialen Funktion (Borg and Caulfield et al. 1981, Weber 1989). Ihre kardiale Transkription ist bei einer dilatativen Kardiomyopathie erhöht und geht mit Fibrosierungsprozessen einher (Pauschinger et al. 1999). Fibronectin 1 (*Fn1*) hat im menschlichen Organismus viele Funktionen (Pankov and Yamada 2002), neben Zelladhäsion, Wachstum, Migration und Differenzierung (Engvall et al. 1978, Pankov and Yamada 2002) ist es außerdem an der Wundheilung beteiligt (Grinell 1984, Valenick et al. 2005). Da der MR an der Regulation dieser Moleküle beteiligt zu sein scheint (Grossmann et al. 2008), wurde die kardiale Transkription dieser Gene für die Beurteilung der MR-abhängigen Fibrosierung des Herzens herangezogen.

Bei Kardiomyopathien, die einer Herzinsuffizienz zugrunde liegen können, treten daneben auch Mutationen in Gene auf, die zu Veränderungen kardialer Ionenkanäle führen. Deren Aktivität kann dabei sowohl gesteigert als auch vermindert sein. Diese so genannten „Kanalopathien“ können z.B. zu einem Long-QT-Syndrom (verlängertes QT-Intervall im EKG) führen, wodurch Arrhythmien entstehen können.

Dem Long-QT-Syndrom Typ II (LQT2) liegt eine verlängerte Repolarisation aufgrund verminderter K^+ -Auswärtsströme (I_K) zugrunde, die durch eine Mutation in der α -Untereinheit, kodiert durch *Kcnh2* (auch: *human Ether-à-go-go-Related Gene (hERG)*), des spannungsabhängigen Kaliumkanals $K_v11.1$ verursacht werden (Levine et al. 2008). Auch eine Mutation im Gen des spannungsabhängigen, langsamen (L-Typ)-Calciumkanals $Ca_v1.2$ *Cacna1c* kann mit einer Verlängerung des QT-Intervalls (LQT8, „Timothy syndrome“) und einer erhöhten zellulären Erregbarkeit einhergehen (Brugada et al. 2007, Pagon et al. 2011). Daher war die Transkription dieser Gene für die Untersuchung einer elektrophysiologischen Funktionsstörung von besonderem Interesse.

Die Untersuchung der mRNA-Expression von *Serpina3* diente als Anhaltspunkt für das Auftreten entzündlicher Prozesse in Anwesenheit von hMR bzw. hMR^{DEF}. Dieses Gen kodiert für den Serin-Peptidase-Inhibitor α_1 -Antichymotrypsin. Hierbei handelt es sich um ein Akut-Phase-Protein, welches das Gewebe bei einer akuten Inflammation vor überschießender Proteaseaktivität schützt.

Bei den α MHC hMR-Tieren wurde aufgrund bereits publizierter Daten (Grossmann et al. 2008) mit einer gesteigerten Transkription dieser Gene gerechnet. Tatsächlich aber ließen sich bei der α MHC hMR-Mauslinie im Vergleich zur WT-mRNA-Expression für den Großteil der untersuchten Gene keine erhöhten mRNA-Mengen finden. Die Transkription des Hypertrophie-Markers β MHC war allerdings, wie erwartet, erhöht. Nach Morkin 2000 tritt bei einer Hypertrophie, neben der Zunahmen der β MHC-mRNA-Menge, eine Abnahme der α MHC-Transkription auf. Überraschenderweise war aber auch die α MHC-mRNA-Menge im Vergleich zur WT-mRNA-Expression erhöht, was mit der Kaliumcanrenoat-Behandlung zusammenhängen könnte. Wie oben bereits beschrieben, wird die α MHC-mRNA-Expression u.a. durch das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin (T_3) reguliert (Morkin 2000). Aufgrund endokriner Nebeneffekte des MR-Inhibitors (Loriaux et al. 1976) wird auch die T_3 -Plasmakonzentration beeinflusst (Semler et al. 1989). Somit könnte die intrauterine MR-Inhibition (s.o.) dauerhaft zu einer veränderten T_3 -Konzentration geführt haben und bei den α MHC hMR-Tieren die α MHC-Transkription dauerhaft verändert worden sein.

Die *Nppb*-mRNA-Expression der α MHC hMR-Mäuse im Vergleich zu WT-Tieren war tendenziell erhöht ($p = 0,091$), die des *Nppa* war dabei nicht verändert bzw. eher reduziert (Abb. 21A). Da ANP unter physiologischen Bedingungen eher von den Vorhöfen sezerniert wird (Yasue et al. 1994), lässt sich das unerwartete Ergebnis der *Nppa*-Analyse vermutlich auf die hier untersuchten Ventrikelproben zurückführen. Erst bei chronischer Volumenbelastung wird ANP, wie BNP, von den Ventrikeln sezerniert. Außerdem könnten die antihypertrophen und antifibrotischen Effekte der MR-Inhibition eine Rolle gespielt haben (Pitt et al. 1999, 2003, Lalevée et al. 2005). Die antifibrotische Wirkung von Kaliumcanrenoat

spiegelte sich zudem in der gegenüber dem WT kaum veränderten Transkription von *Col1a1* und *Col3a1* bzw. der verminderten mRNA-Expression von *Fn1* wider (Abb. 21A).

Die Untersuchung von *Kcnh2* zeigte überraschenderweise eine gesteigerte Transkription im Vergleich zu WT-Mäusen. Für den hMR wurde jedoch ein verminderter K⁺-Auswärtsstrom und eine verlängerte Repolarisation bei Aktionspotenzialen an isolierten Kardiomyozyten transgener Mäusen beschrieben (Ouvrard-Pascaud et al. 2005), so dass hier eher eine verminderte mRNA-Expression zu erwarten war. Eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit detektierte erhöhte *Kcnh2*-mRNA-Menge könnte ebenfalls das Kaliumcanrenoat sein. Der MR-Inhibitor beeinflusst neben der MR-Aktivität und der Schilddrüsenhormonkonzentration (Semler et al. 1989) auch die Kaliumkanäle K_v7.1, minK und K_v11.1 (*hERG*) (Gómez et al. 2005, Caballero et al. 2003). So könnte die intrauterine K_v11.1 (*hERG*)-Blockade zu einer anhaltenden Steigerung der *Kcnh2*-Transkription als Kompensationsmechanismus geführt haben und die erhöhte mRNA-Expression somit nicht zwingend durch den hMR selbst hervorgerufen worden sein. Eine mögliche Veränderung des Kaliumionenstroms (*gain of function* oder *loss of function*) in den Kardiomyozyten der αMHC hMR-Mäuse aufgrund der gesteigerten Transkription von *Kcnh2* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Bei dem zweiten untersuchten Ionenkanal (LTCC, *Cacna1c*) war im Vergleich zum WT ebenfalls eine gesteigerte Transkription in den αMHC hMR-Ventrikeln zu beobachten. Dieses Ergebnis passte dabei sehr gut zu den in isolierten Kardiomyozyten nachgewiesenen vergrößerten Strömen durch den L-Typ Calciumkanal (Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Die erwarteten proinflammatorischen Effekte (Sun et al. 2005, Blasi et al. 2003, Rocha et al. 2002, Krug et al. 2010) zeigten sich in diesem Mausmodell durch eine erhöhte mRNA-Expression von *Serpina3* (Abb. 21A).

Somit war bei den jungen hMR-Tieren auf Transkriptionsebene eine leichte bzw. beginnende Herzerkrankung zu beobachten.

Es konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob die bei dieser Linie beobachteten Effekte durch den transgenen oder den endogenen MR hervorgerufen wurden.

Für den nichtgenomischen MR-Signalweg ist ebenfalls eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren sowie dem klassischen genomischen MR-Signalweg, z.B. via ERK-Phosphorylierung, beschrieben (Mihailidou et al. 2004). Daher war seine Auswirkung auf die Transkription prohypertropher und profibrotischer Gene *in vivo* von besonderem Interesse. Tatsächlich konnten mittels qPCR-Analyse der Herzen sechs Monate alter αMHC hMR^{DEF}-Tiere Unterschiede im Transkriptionsmuster im Vergleich zum WT festgestellt werden. Überraschenderweise zeigten die αMHC hMR^{DEF}-Tiere eine gesteigerte Transkription aller untersuchten Hypertrophie- und Fibrose-assoziierten Gene. Auch die mRNA-Expression für den L-Typ Calciumkanal (*Cacna1c*) war erhöht bzw. die für *Serpina3* tendenziell erhöht

($p = 0,080$, Abb. 21A). Die einzigen Ausnahmen bildeten α MHC und *Kcnh2*, deren mRNA-Expression nicht verändert bzw. eher etwas vermindert war (Abb. 21A). Es zeigten sich somit bei den jungen hMR^{DEF}-Tieren auf Transkriptionsebene prohypertrophe sowie profibrotische Prozesse, Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften und eine beginnende Entzündung, wie sie bei einer Herzinsuffizienz zu erwarten wären. Diese Veränderungen der mRNA-Expression sind möglicherweise auf den endogenen MR zurückzuführen. Dessen erhöhte Transkription könnte dabei durch den hMR^{DEF} über zytosolische Signalkaskaden gesteigert worden sein. Somit wäre der nichtgenomische Signalweg über eine Modulation der genomischen MR-Effekte an der Pathogenese kardialer Erkrankungen beteiligt.

Die Untersuchung der kardialen Erregungsleitung erfolgte mittels Elektrokardiographie (EKG). Aufgrund der beschriebenen MR-abhängigen Modulation kardialer Ionenströme (Ouvrard-Pascaud et al. 2005) wurden hier Veränderungen in der Herzstromkurve im Vergleich zum WT erwartet.

Bei den sechs Monate alten α MHC hMR-Mäusen zeigte sich eine verlängerte gesamtventrikuläre Erregungsdauer (QT-Intervall). Das frequenzkorrigierte QT-Intervall (QT_c-Intervall) war gegenüber dem WT-EKG ebenfalls verlängert, wobei die intraventrikuläre Erregungsausbreitung (QRS-Komplex) unverändert war (Tab. 5). Dies deutete darauf hin, dass eine verlängerte intraventrikuläre Repolarisation dem verlängerten QT_c-Intervall zugrunde lag. Eine Verlängerung des QT_c-Intervalls kann dabei durch einen vergrößerten Calciumstrom verursacht werden, wie er z.B. beim LQTS8 vorliegt (Pagon et al. 2011). Hierfür würde die bei diesen Mäusen beobachtete erhöhte Transkription von *Cacna1c* sprechen. Tatsächlich konnte bereits an isolierten Kardiomyozyten von transgenen Mäusen mit herzspezifischer Überexpression des hMR gezeigt werden, dass der L-Typ Calciumstrom vergrößert ist (Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Bei den sechs Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tieren, deren *Cacna1c*-mRNA-Expression im Vergleich zum WT ebenfalls erhöht war, zeigte sich jedoch keine Verlängerung der ventrikulären Erregungsleitung (Tab. 5). Somit haben vermutlich noch andere Faktoren für die QT_c-Intervallverlängerung der sechs Monate alten α MHC hMR-Mäuse eine Rolle gespielt. Denkbar wäre z.B., dass entzündliche Prozesse hier von Bedeutung gewesen sein könnten. Diese Vermutung wird durch die erhöhte *Serpina3*-Transkription bekräftigt. Möglich wäre auch, dass ein verminderter Kaliumauswärtsstrom aufgrund eines Kaliumkanaldefekts (*loss of function*) der verlängerten Erregungsrückbildung zugrunde lag. Dies könnte die erhöhte *Kcnh2*-mRNA-Menge bei diesen Mäusen erklären. Im EKG der jungen α MHC hMR^{DEF}-Tiere waren gegenüber WT keine Veränderungen zu erkennen (Tab. 26).

Durch die i.p. ISO-Injektion konnten die Herzfrequenz (HF) nicht-narkotisierter Mäuse zwar nicht erreicht werden, die HF unter β -Adrenozeptor-Stimulation lag jedoch deutlich dichter an diesen Werten (Tab. 6). Die erfolgreiche Stimulation konnte dabei durch den Anstieg der HF bei allen drei Genotypen belegt werden (Abb. 24A). Wie bereits unter Kontrollbedingungen erkennbar, war unter der β -Adrenozeptor-Stimulation bei den sechs Monate alten α MHC hMR-Mäusen eine Verlängerung des QT- und QT_c-Intervalls gegenüber dem WT-EKG zu beobachten (Tab. 6). Die jungen α MHC hMR^{DEF}-Tiere wiesen auch unter der β -Adrenozeptor-Stimulation keine Unterschiede zum WT-EKG auf (Tab. 6).

Die ISO-abhängigen Änderungen im EKG der transgenen Mäuse entsprachen dabei weitestgehend denen der WT-Tiere (Abb. 24A). Unter β -Adrenozeptor-Stimulation konnten im Oberflächen-EKG keine Arrhythmien bei den WT-, α MHC hMR^{DEF}- oder α MHC hMR-Tieren dieser Altersgruppe beobachtet werden.

Abschließend wurden die, aufgrund MR-abhängiger Fibrosierung des Herzgewebes (Unger and Li 2004, Reil et al. 2012, Brilla et al. 1992), erwarteten funktionellen Veränderungen anhand zweidimensionaler Echokardiographie untersucht (Tab. 7).

Hierbei zeigten die sechs Monate alten α MHC hMR-Mäuse lediglich eine erhöhte Herzfrequenz (HF) im Vergleich zu WT-Tieren, weitere Unterschiede waren bei diesen Tieren nicht zu erkennen (Tab. 7). Die sechs Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse wiesen einen tendenziell erhöhten endsystolischen Kammerdurchmesser ($p = 0,061$), sowie ein tendenziell erhöhtes endsystolisches Volumen ($p = 0,068$) auf. Diese Ergebnisse könnten auf eine Dilatation des linken Ventrikels hindeuten und korrelieren damit gut mit der gesteigerten Transkription von Col1a1 und Col3a1, wie sie bei einer dilatativen Kardiomyopathie zu finden ist (Pauschinger et al. 1999). Weitere funktionelle Unterschiede zu WT-Mäusen konnten bei der Untersuchungsgruppe mit sechs Monaten jedoch nicht festgestellt werden (Tab. 7).

Mittels der ISO-i.p.-Injektion konnten auch hier die HF von nicht-narkotisierten Mäusen nicht erreicht werden, jedoch war die HF unter β -Adrenozeptor-Stimulation ebenfalls deutlich näher an den entsprechenden Werten (Tab. 8). Die erfolgreiche Stimulation konnte hier, wie im EKG, durch den Anstieg der HF bei allen drei Genotypen belegt werden (Abb. 26A). Da die ISO-bedingte Änderung bei den transgenen Mäusen weitestgehend denen der WT-Tiere entsprach (Abb. 26A), zeigten sich in der Gruppe der sechs Monate alten Mäuse unter β -Adrenozeptor-Stimulation keine Unterschiede im EKG (Tab. 8).

5.3 Kardialer Phänotyp der zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse

Die Inzidenz einer Herzinsuffizienz steigt mit zunehmendem Alter (> 10% der über 80-Jährigen sind betroffen), wobei die Überlebenszeit - abhängig vom Schweregrad der Erkrankung - zwischen ein und fünf Jahren beträgt (McMurray et al. 2012). Daher sollte im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht werden, in welcher Weise sich eine kardiale Überexpression des nichtgenomischen Signalwegs zu einem späteren Lebenszeitpunkt äußerte. Die hierfür ausgewählten zwölf Monate alten Mäuse entsprachen dabei dem menschlichen Lebensabschnitt zwischen 40 und 50 Jahren (Flurkey et al. 2007). Da die α MHC hMR-Linie, wie oben beschrieben, eine hohe postnatale Mortalität aufwies und unbekannt war, ob diese nach Absetzen des MR-Inhibitors wieder auftreten würde, wurden die Tiere dieser Altersgruppe ebenfalls bis einen Monat vor den Untersuchungen mit Kaliumcanrenoat behandelt. Alle transgenen Tiere dieser Gruppe überlebten dabei die anschließenden vier Wochen bis zum Versuchszeitpunkt (Abb. 17B). Um zu untersuchen, ob und wann die genomisch-vermittelte Letalität wieder auftreten würde, wurde eine zusätzliche Gruppe von α MHC hMR-Mäusen untersucht, die den MR-Inhibitor nur bis zum Alter von sechs Monaten erhielt. Anschließend bekamen diese transgenen Tiere (hMR⁺) über einen Zeitraum von weiteren sechs Monate reines Leitungswasser ad libitum. Die kardialen Parameter wurden bei α MHC hMR⁺-Tieren somit ebenfalls im Alter von zwölf Monaten untersucht. Ohne MR-Inhibition überlebten dabei nicht alle der α MHC hMR⁺-Tiere bis zum Versuchszeitpunkt (Anhang Abb. 33). Daraus folgt, dass die genomisch-vermittelte Letalität vermutlich von der Dauer der Kaliumcanrenoat-Behandlung bzw. der postnatalen hMR-Aktivität abhängt.

Bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen war dagegen bis zum Alter von zwölf Monaten keine erhöhte Sterblichkeit zu beobachten (Abb. 17B).

Die Untersuchung der morphologischen Parameter der zwölf Monate alten Tiere ergab bei den zwölf Monate alten α MHC hMR-Tieren im Vergleich zu den WT-Mäusen ein vermindertes Körpergewicht. Dies könnte durch die Behandlung mit Kaliumcanrenoat und einer damit verbundenen verzögerten Entwicklung aufgrund hormoneller Nebenwirkungen der MR-Inhibition aufgetreten sein (Loriaux et al. 1976, Semler et al. 1989). Das relative Herzgewicht dieser Tiere war gegenüber den WT-Mäusen dabei nicht erhöht (Tab. 3), wohingegen das relative Herzgewicht der α MHC hMR⁺-Mäuse, die etwa genauso viel wogen wie die gleichaltrigen WT-Tiere, erhöht war (Anhang Tab. 31).

Bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen war die myokardiale Masse im Vergleich zu den gleichaltrigen WT-Tieren unverändert (Tab. 3).

Somit scheint nur der genomische MR-Signalweg, abhängig von der Dauer der Kaliumcanrenoat-Behandlung, die myokardiale Masse zu steigern.

Für die Untersuchung der α MHC-abhängigen kardialen Transkriptionsrate der transgenen Rezeptoren, wurde bei den zwölf Monate alten Tieren ebenfalls die mRNA-Expression des gekoppelten *eGFP* herangezogen. Da beide hMR-Varianten das *eGFP* enthielten, konnten auch hier durch die ermittelten *eGFP*-mRNA-Mengen bei beiden Mauslinien Rückschlüsse auf die mRNA-Expression des entsprechenden Rezeptors gezogen werden. Es zeigte sich, dass sowohl bei den α MHC hMR- (Tab. 4) als auch bei den α MHC hMR⁺-Mäusen (Anhang Tab. 32) die *eGFP*-mRNA deutlich später detektierbar war als bei den gleichaltrigen α MHC hMR^{DEF}-Mäusen (Tab. 4), wodurch sich auch bei den zwölf Monate alten Mäusen eine geringere mRNA-Menge für den transgenen hMR-Rezeptor ergab. Da die transgenen Rezeptoren, wie bereits erwähnt, durch den α MHC-Promotor reguliert wurden, lag auch hier zunächst die Vermutung nahe, dass bei den α MHC hMR-/ α MHC hMR⁺-Tieren die α MHC-Transkription Kaliumcanrenoat-abhängig verändert worden sein könnte. Die Analyse von α MHC (siehe unten) zeigte jedoch, dass bei den zwölf Monate alten α MHC hMR- (Abb. 21B) und α MHC hMR⁺-Mäusen (Anhang Tab. 32), mehr α MHC transkribiert wurde als bei den α MHC hMR^{DEF}-Tieren (Abb. 21B), womit diese Hypothese verworfen werden musste. Daher waren die unterschiedlichen mRNA-Mengen der zwölf Monate alten transgenen Tiere vermutlich ebenfalls auf eine zufällig integrierte Menge der Konstrukte zurückzuführen (Taketo et al. 1991). Zwischen den beiden α MHC hMR-Gruppen zeigten sich keine Unterschiede in den *eGFP*-mRNA-Mengen (Anhang Tab. 32), wodurch die kardiale hMR-Transkription scheinbar unabhängig von der Dauer der Kaliumcanrenoat-Behandlung war.

Die Untersuchung der kardiale Transkription des endogenen MR (*Nr3c2*) mittels qPCR ergab eine um den Faktor 30 gesteigerte mRNA-Menge bei den zwölf Monate alten α MHC hMR-Tieren im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abb. 19B). Eine ähnlich hohe *Nr3c2*-Transkription zeigte sich ebenfalls bei den α MHC hMR⁺-Mäusen (Anhang Abb. 35). Somit war die mRNA-Expression des endogenen MR vermutlich ebenfalls unabhängig von der Dauer der Kaliumcanrenoat-Behandlung. Die *Nr3c2*-mRNA-Expression der zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse entsprach etwa der Transkription des endogenen MR bei gleichaltrigen WT-Tieren (Abb. 19B). Daher war bei den zwölf Monate alten α MHC hMR-Tieren von einer höheren Aktivität des endogenen MR auszugehen als bei gleichaltrigen α MHC hMR^{DEF}-Mäusen.

Weitere qPCR-Untersuchungen zeigten, dass die mRNA-Mengen der untersuchten Gene der zwölf Monate alten α MHC hMR-Tieren im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren erhöht

waren (Abb. 21B). Die erwarteten prohypertrophen und profibrotischen Prozesse im Herzen der α MHC hMR-Mäuse zeigten sich hier besonders in der erhöhten mRNA-Expression von *Nppa*, *Nppb*, β MHC, *Col3a1* und *Fn1*. Bei den α MHC hMR⁺-Mäusen war die Transkription dieser Gene im Vergleich zu den WT-Tieren ebenfalls erhöht (Anhang Abb. 36), wobei die *Nppb*-mRNA-Expression bei den α MHC hMR⁺-Mäusen gegenüber den α MHC hMR- Herzen noch anstieg (Anhang Abb. 36). Die Erhöhung der BNP-mRNA-Menge korreliert dabei mit der beobachteten Steigerung der myokardialen Masse bei den α MHC hMR⁺-Mäusen (siehe oben) und deutet auf das Vorliegen einer Herzinsuffizienz hin (McMurray et al. 2012). Daneben konnte bei den alten Tieren mit der kardialen hMR-Überexpression, wie erwartet, eine erhöhte mRNA-Expression von *Cacna1c* und *Serpina3* im Vergleich zu den WT-Ventrikeln beobachtet werden. In dieser Altersgruppe trat ebenfalls eine gegenüber WT-Tieren erhöhte α MHC- sowie *Kcnh2*-Transkription auf (Abb. 21B). Die mRNA-Expression von α MHC und *Kcnh2* war dabei unabhängig von der Dauer der Kaliumcanrenoat-Behandlung (Anhang Abb. 36). Die alten α MHC hMR-Tiere wiesen somit ein Transkriptionsmuster auf, welches bei einer Herzinsuffizienz erwartet werden könnte.

Anhand des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modells konnte bei den alten Tieren ebenfalls nicht zwischen den Effekten des endogenen und des transgenen MR differenziert werden. Größtenteils scheinen die Auswirkungen jedoch unabhängig von der Kaliumcanrenoat-Behandlungsdauer zu sein, da nur die *Nppb*-Transkription der α MHC hMR⁺-Tiere noch weiter anstieg.

Die zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tiere wiesen dagegen ein anderes mRNA-Expressionsmuster auf. Hier war die Transkription des prohypertrophen Gens *Nppa* zwar gegenüber gleichaltrigen WT-Mäusen erhöht, die mRNA-Mengen von *Nppb*, α MHC und β MHC jedoch unverändert (Abb. 21B). *Col1a1*, *Col3a1* und *Fn1* zeigten gegenüber den WT-Tieren keine oder nur eine tendenzielle Erhöhung ($p = 0,073$ für *Fn1*) der mRNA-Mengen. Ebenfalls waren keine Unterschiede in der Transkription von *Serpina3* und *Cacna1c* gegenüber den WT-Tieren detektierbar. Auffällig war daneben die im Vergleich zu den WT-Mäusen tendenziell verminderte ($p = 0,066$) mRNA-Menge von *Kcnh2*.

Bei den zwölf Monate alten Tieren mit kardialer hMR^{DEF}-Überexpression entsprach somit das Transkriptionsmuster insgesamt etwa dem der gleichaltrigen WT-Tiere (Abb. 21B). Aufgrund der zuvor bei den sechs Monate alten Tieren dieser Linie beobachteten profibrotischen, prohypertrophen sowie proinflammatorischen kardialen Prozesse (Abb. 21A, Abschnitt 5.2) war eher ein Fortschreiten dieser Vorgänge erwartet worden. Das bei den alten Tieren beobachtete Transkriptionsmuster könnte dabei auf die etwa gleich großen *Nr3c2*-mRNA-Mengen der zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}- und WT-Mäuse zurückführen sein. Somit

scheint der nichtgenomische MR-Signalweg selbst keine profibrotischen, prohypertrophen oder proinflammatorischen Effekte zu haben.

Mittels Elektrokardiographie (EKG) wurde bei den zwölf Monate alten Tieren ebenfalls die kardiale Erregungsbildung und Erregungsleitung untersucht, zunächst unter Kontrollbedingungen und anschließend unter β -Adrenozeptor-Stimulation.

Hier zeigte sich bei den α MHC hMR-Tieren ein verkürzter QRS-Komplex im Vergleich zu den WT-Mäusen (Tab. 5), welches eventuell auf die veränderte mRNA-Expression der untersuchten Ionenkanäle zurückzuführen war, wodurch sich eine veränderte Proteinexpression ergeben haben könnte (Abb. 21B). Bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tieren waren im EKG unter Kontrollbedingungen gegenüber den WT-Mäusen keine Unterschiede zu beobachten (Tab. 5).

Durch die ISO-i.p.-Injektion konnten die Herzfrequenz nicht-narkotisierter Mäuse zwar nicht erreicht werden, sie lag unter β -Adrenozeptor-Stimulation jedoch deutlich näher an den entsprechenden Werten (Tab. 6). Die erfolgreiche Stimulation konnte dabei durch den Anstieg der Herzfrequenzen nach der Injektion bei allen untersuchten Gruppen belegt werden (Abb. 24B). Die zwölf Monate alten α MHC hMR-Mäuse zeigten unter ISO gegenüber den WT-Tieren neben einer höheren Herzfrequenz, wie schon unter Kontrollbedingungen, ein verkürzten QRS-Komplex, womit die intraventrikuläre Erregungsbildung auch bei annähernd physiologischer Herzfrequenz gegenüber den zwölf Monate alten WT-Mäusen verkürzt war. Da das QT-Intervall nicht verändert war, könnte eine schnellere Depolarisation in den ventrikulären Kardiomyozyten dem verkürzten QRS-Komplex zugrunde liegen. Hierfür spräche auch die erhöhte kardiale Transkription von *Cacna1c* (Abb. 21B).

Die zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse wiesen unter ISO im Vergleich zum WT eine verlängerte intraventrikuläre Erregungsdauer auf (Tab. 6). Da der QRS-Komplex gegenüber den WT-Tieren nicht verändert war, lag dem verlängerten QT_c- Intervall vermutlich eine verzögerte Repolarisation zugrunde. Diese könnte dabei durch die tendenziell verminderte Transkription von *Kcnh2* hervorgerufen worden sein (Abb. 21B).

Abschließend wurden die linksventrikuläre Herzfunktion und Dimensionen mittels zweidimensionaler Echokardiographie untersucht (Tab. 7).

Zwar waren die linksventrikulären Dimensionen der zwölf Monate alten α MHC hMR-Tiere im Vergleich zu den WT-Mäusen vermindert, es traten jedoch keine Funktionsstörungen auf (Tab. 7). Die verminderte kardiale Wanddicke ist dabei vermutlich auf die antihypertrophen bzw. antifibrotischen Effekte der MR-Inhibition zurückzuführen (Pitt et al. 1999, 2003).

Bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tieren zeigte sich sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter ISO gegenüber den WT- Herzen eine verminderte

kardiale Wanddicke, jedoch konnten ebenfalls keine funktionellen Unterschiede festgestellt werden (Tab. 7 und 8).

5.4 Altersabhängige Änderung in den Herzen der α MHC hMR^{DEF}-Mäuse

Alterungsprozesse sind komplexe Vorgänge, die durch genetische, metabolische, hormonale, immunologische und strukturelle Veränderungen hervorgerufen werden (Karavidas et al. 2010). Um die Ergebnisse der jungen und alten Versuchstiere des jeweiligen Genotyps besser beurteilen zu können, wurde nun die altersabhängigen Veränderungen untersucht.

Altersbedingt kommt es zu einer kardialen Hypertrophie durch Zunahme der Wanddicke und des Kardiomyozytenvolumens (Lakatta and Sollot 2002, Lakatta 2003). Bei den WT-Mäusen war diese Veränderung in der altersabhängigen Zunahme der morphologischen Parameter zu beobachten (Abb. 18). Außerdem zeigte sich der erwartete Anstieg der kardialen Wanddicke in der echokardiographischen Untersuchung (Abb. 25).

Die Untersuchung des endogenen MR auf Transkriptionsebene ergab altersabhängig eine Zunahme der *Nr3c2*-mRNA-Expression bei den WT-Tiere (Abb. 20). Weitere qPCR-Analysen zeigten außerdem eine Zunahme der kardialen Hypertrophie-Marker *Nppb*, α und β MHC (Abb. 22), wodurch sich auf Transkriptionsebene ebenfalls die Entwicklung einer altersabhängigen Hypertrophie bestätigte. Die mRNA-Mengen der α -Untereinheiten der untersuchten Ionenkanäle und des Akut-Phase-Proteins stiegen altersabhängig ebenfalls an. Die prohypertrophen und proinflammatorischen Prozesse könnten dabei auf die gesteigerte Transkription des endogenen MR zurückzuführen sein (Blasi et al. 2003, Brilla and Weber 1992, Marney and Brown 2007).

Altersabhängig zeigte sich bei den WT-Tieren keine Veränderung im EKG (Abb. 23). Mittels echokardiographischer Untersuchung waren altersbedingt ebenfalls keine funktionellen Veränderungen zu beobachten (Abb. 25).

Somit waren bei den WT-Tieren wie erwartet erste Anzeichen einer kardialen Hypertrophie zu beobachten (Arbab-Zadeh et al. 2004, Lakatta 2003, Lakatta and Sollot 2002), diese führten bei den zwölf Monate alten FVB/N-WT-Mäusen jedoch nicht zu einer verminderten Herzfunktion.

Bei den α MHC hMR-Mäusen waren die morphologischen Parameter altersabhängig kaum verändert (Abb. 18). Die myokardiale Masse der α MHC hMR⁺-Tiere war zwar gegenüber den jungen α MHC hMR-Mäusen ebenfalls nicht erhöht, sie stieg jedoch soweit an, dass sie bei

den α MHC hMR⁺-Tiere letztlich im Vergleich zu gleichaltrigen WT-Tieren vergrößert war (Anhang Abb. 34 und Tab. 31). Somit wurde die Vermutung bekräftigt, dass die Kaliumcanrenoat-Behandlungsdauer bei der altersabhängigen Zunahme der myokardialen Masse eine entscheidende Rolle gespielt haben könnte.

Die *eGFP*-mRNA sowohl der zwölf Monate alten α MHC hMR-Mäuse als auch der gleichaltrigen α MHC hMR⁺-Tiere war mittels qPCR deutlich früher detektierbar als bei den jungen Mäusen dieser Linie (Δ Ct *eGFP*: jung 13,8 vs. alt 11,9, Tab. 4 und Anhang Tab. 32), dementsprechend exprimierten die alten Tiere mehr hMR-mRNA als die jungen α MHC hMR-Mäuse. Die Dauer der Kaliumcanrenoat-Behandlung hatte dabei scheinbar keinen Einfluss auf die kardiale Transkription von *eGFP* bzw. hMR. Vielmehr könnte die erhöhte *eGFP*-mRNA-Menge auf die altersabhängig gesteigerte Transkription von α MHC zurückzuführen sein (Abb. 22), wobei zwischen den α MHC hMR- und den α MHC hMR⁺-Mäusen auch kein Unterschied in der α MHC-mRNA-Expression auftrat (Abb. 37) und somit die Dauer der Kaliumcanrenoat-Behandlung ebenfalls keinen Einfluss auf die kardiale α MHC-Transkription hatte.

Altersbedingt stieg bei den α MHC hMR-Tieren die *Nr3c2*-Transkription deutlich stärker an als bei den WT-Tieren (Abb. 20), wodurch sich die um den Faktor 30 erhöhte *Nr3c2*-mRNA-Menge der alten α MHC hMR-Tieren gegenüber den gleichaltrigen WT-Tieren erklärt (Abb. 19B) und daher bei den alten transgenen Tieren von einer höheren Aktivität des endogenen MR auszugehen war. Für die α MHC hMR⁺-Tiere zeigte sich altersabhängig der gleiche Anstieg der *Nr3c2*-mRNA-Menge (Anhang Abb. 37) und gegenüber gleichaltrigen WT-Tieren eine ebenfalls um etwa den um den Faktor 30 erhöhte *Nr3c2*-mRNA-Menge, wodurch auch hier ein Effekt durch die unterschiedlich lange Behandlung mit Kaliumcanrenoat ausgeschlossen werden konnte. Weitere qPCR-Analysen zeigten bei den α MHC hMR-Tieren eine altersbedingte Steigerung der Transkription aller untersuchten Gene (Abb. 22), die nur für *Nppb* bei den α MHC hMR⁺-Tieren noch weiter zunahm (Abb. 37). Dies bestätigt ebenfalls die Vermutung, dass die Dauer der (h)MR-Aktivierung bzw. der Behandlung mit Kaliumcanrenoat eine Rolle für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie spielt. Die Erhöhung der mRNA-Mengen der weiterhin untersuchten Gene könnte dabei auf die gesteigerte Transkription des endogenen MR zurückzuführen oder aber durch die höhere Aktivität des transgenen MR verursacht worden sein.

Im EKG der α MHC hMR-Tiere zeigte sich altersabhängig eine verkürzte atrioventrikuläre Überleitungszeit (Abb. 23), die eventuell auf die gesteigerte Transkription der α -Untereinheiten der Ionenkanäle zurückzuführen war. Funktionell äußerte sich dies jedoch bei der echokardiographischen Untersuchung nicht (Abb. 25).

Somit konnten bei den α MHC hMR-Tieren altersabhängig prohypertrophe, profibrotische und proinflammatorische Prozesse beobachtet werden, die abhängig von der Dauer der (h)MR-

Aktivierung gegenüber den gleichaltrigen WT-Mäusen zu einer Steigerung der myokardialen Masse führten.

Die Untersuchung der morphologischen Parameter der α MHC hMR^{DEF}-Mäuse zeigte, dass die myokardiale Masse altersabhängig kaum anstieg (Abb. 18) und die kardialen Veränderungen der transgenen Tieren somit weniger stark ausgeprägt waren als bei WT-Tieren.

Bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen war altersabhängig eine Abnahme der *eGFP*-Transkription zu beobachten (Δ Ct *eGFP*: jung 6,6 vs. alt 8,1; Tab. 4), die alten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse exprimierten demnach weniger hMR^{DEF}-mRNA als die sechs Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tiere. Da die α MHC-mRNA-Expression jedoch altersabhängig tendenziell anstieg ($p = 0,066$; Abb. 22), sind die unterschiedlichen mRNA-Menge zwischen den beiden Altersgruppen des nichtgenomischen Modells vermutlich auf eine altersabhängig veränderte Abbaurate bzw. eine verminderte Stabilität der *eGFP*/hMR^{DEF}-mRNA zurückzuführen. Altersabhängig war dabei die *Nr3c2*-mRNA-Menge der α MHC hMR^{DEF}-Mäuse unverändert (Abb. 20), wodurch die Transkription der zwölf Monate alten WT- und hMR^{DEF}-Tiere etwa gleich hoch war (Abb. 19B, Abschnitt 5.3). Nimmt man, wie bereits diskutiert, für den hMR^{DEF} an, dass er die Transkription des endogenen MR beeinflusste, so könnte die unveränderte *Nr3c2*-mRNA-Menge durch die geringere (mRNA-)Menge des transgenen Rezeptors in den Herzen der zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäuse erklärbar sein.

Altersabhängig stieg bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen die Transkription von *Nppa* und *Serpina3* ähnlich wie bei den WT-Tieren (Abb. 22). Die mRNA-Expression von *Fn1* nahm dabei altersabhängig wie bei den WT-Tieren ab, wobei die Transkription der weiterhin untersuchten Gene nicht verändert bzw. eher vermindert war (Abb. 22). Daher war gegenüber den zwölf Monate alten WT-Mäusen, bei annähernd gleichen *Nr3c2*-mRNA-Mengen, nur die *Nppa*-Transkription der α MHC hMR^{DEF}-Tiere erhöht (Abb. 20), dabei lassen sich diese antihypertrophen/antifibrotischen Effekte vermutlich auf die unveränderte Aktivität des endogenen MR der α MHC hMR^{DEF}-Mäuse bzw. dessen gesteigerte Aktivität bei den WT-Mäusen zurückführen.

Im EKG der α MHC hMR^{DEF}-Tiere zeigte sich altersabhängig eine Verlängerung des QT_c-Intervalls, wodurch das Auftreten von Arrhythmien bei den zwölf Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen begünstigt wurde (Abb. 23). Die Veränderungen im EKG manifestierten sich jedoch bei den alten α MHC hMR^{DEF}-Tieren nicht funktionell (Abb. 25). Somit fielen bei den α MHC hMR^{DEF}-Tieren altersabhängig besonders Veränderungen im EKG auf, die bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen eine Rolle spielen könnten.

5.5 Pathologische hMR^{DEF}-Aktivierung durch Aldosteron und Natriumchlorid

Physiologisch ist der endogene MR-Ligand Aldosteron (Aldo) über das Renin-Angiotensin-Aldosteron System an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts, v.a. von Natrium und Kalium, beteiligt (Pryce et al. 2005, Grossmann und Gekle 2009). Daneben treten aldosteroninduziert am Herzen pathologische Veränderungen auf, die die Entwicklung von Herzerkrankungen begünstigen (Brilla et al. 1993, 1992, Reil et al. 2012, Rossi et al. 1997, Swedberg et al. 1990, Young and Funder 2003). Unbekannt ist jedoch welche Rolle eine Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs durch ein unphysiologisches Verhältnis von Aldo und NaCl in der kardialen Pathogenese spielt.

Über die NaCl-Plasmakonzentration unterliegt die Aldo-Sekretion einem negativen Feedbackmechanismus, wobei hohe NaCl-Plasmakonzentrationen die Aldo-Sekretion hemmen. Um den Aldo-Plasmaspiegel konstant zu halten bzw. zu erhöhen, mussten daher zur Erzeugung eines unphysiologischen Aldo/NaCl-Verhältnisses (hohe NaCl-Plasmakonzentration bei normaler bis erhöhter Aldo-Plasmakonzentration) neben NaCl auch Aldo zugeführt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit auf eine $\frac{2}{3}$ Nephrektomie, welche zu einem starken Blutdruckanstieg geführt hätte (Young et al. 1994), verzichtet wurde, konnten gezielt die durch Aldo- und NaCl-medierte Effekte untersucht und die Auswirkungen einer pathologischen Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs durch ein unphysiologisches Verhältnis von Aldo und Natriumchlorid (NaCl) *in vivo* analysiert werden.

Durch die Behandlung mit Mineralokortikoiden war eine Zunahme der mykardialen Masse zu erwarten (Reil et al. 2012), daher wurden die morphologischen Parameter zunächst im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Hier zeigte sich, dass weder bei den WT/Aldo+NaCl-Tieren noch bei den behandelten α MHC hMR^{DEF}-Mäusen das relative Herzgewicht gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren erhöht war (Abb. 27). Somit konnte bei beiden behandelten Gruppen kein Anstieg der mykardialen Masse beobachtet werden. Dies ist vermutlich auf die relativ kurze Behandlungsdauer von vier Wochen zurückzuführen, da eine Behandlung über acht Wochen zu einem erhöhten relativen Herzgewicht der behandelten Tiere führt (Reil et al. 2012).

Die Untersuchung der kardialen *eGFP*-Transkription der α MHC hMR^{DEF}-Mäuse zeigte, dass unter der Aldo/NaCl-Behandlung die *eGFP*-mRNA mittels qPCR später detektierbar war als bei den α MHC hMR^{DEF}/Kontrolltieren (Δ Ct *eGFP*: Kontrolle 6,6 vs. Aldo+NaCl: 7,5, Tab. 10). Dementsprechend musste davon ausgegangen werden, dass unter der Aldo/NaCl-Behandlung ebenfalls weniger hMR^{DEF}-mRNA exprimiert wurde. Da die Transkription des

eGFP/hMR^{DEF} durch den α MHC-Promotor reguliert wurde, sollte die Analyse der α MHC-Transkription Aufschluss über eine unter der Aldo/NaCl-Behandlung möglicherweise veränderte Promotor-Aktivität geben. Dabei zeigte sich, dass die α MHC-mRNA-Menge der mit Aldo und NaCl behandelten α MHC *hMR^{DEF}*-Tiere gegenüber der Kontrolle tatsächlich reduziert war (Abb. 28). Dies legte die Vermutung nahe, dass der α MHC-Promotor bei pathologischer *hMR^{DEF}*-Aktivierung weniger aktiv war, was zu einer reduzierten *eGFP/hMR^{DEF}*-mRNA-Expression führte.

Unter der Aldo/NaCl-Behandlung war die mRNA-Expression des endogenen MR (*Nr3c2*) der WT-Tiere gegenüber der WT/Kontrolle unverändert (Abb. 28). Die behandelten α MHC *hMR^{DEF}*-Mäuse zeigten dagegen eine Abnahme der *Nr3c2*-mRNA-Expression gegenüber den *hMR^{DEF}*/Kontrolltieren (Abb. 28), was die Vermutung nahe legt, dass die Aldo/NaCl-Behandlung selbst keinen Einfluss auf die Transkription des endogenen MR hatte. Nimmt man jedoch, wie bereits diskutiert, an, dass der *hMR^{DEF}* die Transkription des endogenen MR über zytosolische Interaktionen u.a. mit PKC, MAPK oder dem EGFR (Grossmann et al. 2005, Grossmann und Gekle 2008, Grossmann et al. May 2010) beeinflusst, so könnte die bei den α MHC *hMR^{DEF}*/Aldo+NaCl-Mäusen beobachtete Abnahme der *Nr3c2*-mRNA-Menge durch die, im Vergleich zu den Kontrolltieren, verminderte Transkription des *hMR^{DEF}* hervorgerufen worden sein. Die Aktivität des endogenen MR der behandelten *hMR^{DEF}*-Tiere war gegenüber der Kontrolle somit vermutlich vermindert.

Zwischen den beiden behandelten Gruppen zeigte sich kein Unterschied in der *Nr3c2*-Transkription (Abb. 29), wodurch der endogenen MR in den beiden Behandlungsgruppen vermutlich eine ähnliche Aktivität aufwies.

Weitere qPCR-Analysen ergaben, dass die kardiale Transkription von *Nppb*, β MHC und *Col1a1* der WT/Aldo+NaCl-Tiere gegenüber ihrer Kontrolle erhöht war (Abb. 28). Somit konnten bei den WT-Mäusen unter der Aldo/NaCl-Behandlung Veränderungen im Transkriptionsmuster beobachtet werden, die prohypertrophe und profibrotische Mechanismen begünstigen (Unger and Li 2004, Reil et al. 2012, Luchner et al. 2003, Potter et al. 2009).

Die Untersuchung der kardialen mRNA-Expression der mit Aldo und NaCl behandelten α MHC *hMR^{DEF}*-Tieren zeigte dagegen eine verminderte Transkription von α MHC, β MHC, *Fn1*, *Kcnh2* und *Cacna1c* gegenüber der *hMR^{DEF}*/Kontrolle (Abb. 28). Unter der Aldo/NaCl-Behandlung traten somit bei den α MHC *hMR^{DEF}*-Tieren keine prohypertrophen oder profibrotischen Prozesse auf. Die Reduktion der prohypertrophen, profibrotischen und auch proinflammatorischen Transkription könnte dabei auf die, im Vergleich zur *hMR^{DEF}*/Kontrolle, verminderte *Nr3c2*-mRNA-Expression zurückzuführen sein.

Unter der Annahme, dass die behandelten Gruppen annähernd gleiche Aktivität des endogenen MR aufwiesen und der nichtgenomische MR-Signalweg selbst, wie bereits diskutiert, keine prohypertrophen, profibrotischen oder proinflammatorischen Effekte hatte, wurden zwischen den behandelten Gruppen keine Unterschiede in der kardialen mRNA-Expression erwartet. Die Analyse ergab jedoch, dass die mRNA-Mengen von *Nppa* und *Nppb* in den α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Herzen im Vergleich zu den WT/Aldo+NaCl-Mäusen erhöht war (Abb. 29), wobei die *Nppa*-mRNA-Menge der WT-Mäuse unter der Behandlung kaum anstieg, die *Nppb*-mRNA-Menge dagegen deutlich erhöht war. Bei den α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tieren war die Transkription dieser Gene gegenüber der Kontrolle dagegen nahezu unverändert (Abb. 28). Somit könnte die im Vergleich zu den WT/Aldo+NaCl-Mäusen erhöhte Transkription bei den α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tieren darauf zurückzuführen sein, dass zu dem Zeitpunkt, an dem die Aldo/NaCl-Behandlung begonnen wurde, in den α MHC hMR^{DEF}-Herzen bereits prohypertrophe Prozesse auftraten, wie sie bei den unbehandelten sechs Monate alten α MHC hMR^{DEF}-Tieren beobachtet wurden (Abschnitt 5.2).

Im Vergleich zu den WT/Aldo+NaCl-Mäusen fiel bei den behandelten α MHC hMR^{DEF}-Tieren besonders eine reduzierte Transkription von α MHC und *Kcnh2* auf (Abb. 29). Die mRNA-Mengen dieser Gene waren im Vergleich zur Kontrolle bei den WT-Tieren unter Aldo und NaCl kaum verändert (Abb. 28). Bei den α MHC hMR^{DEF}-Mäusen nahm sie gegenüber der Kontrolle unter der Aldo/NaCl-Behandlung dagegen ab (Abb. 28). Daher lag zum einen die Vermutung nahe, dass eine pathologische Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs die kardiale Transkription von α MHC reduziert, was zu einer verminderten Expression dieser kardialen Myosinisoform auf Proteinebene führen und damit die Herzfunktion negativ beeinflussen könnte (Ouvrard-Pascaud et al. 2004, Ng et al. 1991, Morkin 2000, Nakao et al. 1997). Zum anderen wurde durch die verminderte *Kcnh2*-mRNA-Expression bei pathologischer hMR^{DEF}-Aktivierung die Hypothese bestärkt, dass der nichtgenomische MR-Signalweg die kardiale Erregungsleitung beeinflusst und somit Herzrhythmusstörungen begünstigt (Levine et al. 2008).

Da die verminderte kardiale *Kcnh2*-Transkription der α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tieren (s.o.) eine verlängerte Repolarisation vermuten ließ, war die EKG-Untersuchung der behandelten Tiere von besonderem Interesse.

Im Vergleich zur Kontrolle trat bei den α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tieren sowohl ein verlängerter QRS-Komplex als auch ein längeres QT-Intervall auf (Abb. 30), wodurch das QT_c-Intervall der α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tieren gegenüber den WT/Aldo+NaCl-Mäusen verlängert war (Tab. 11). Die pathologische Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs führte somit, vermutlich durch eine verminderte Transkription von *Kcnh2*, zu

Störungen in der kardialen Erregungsrückbildung. Mittels Oberflächen-EKG konnten jedoch bei den α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tieren keine Arrhythmien beobachtet werden.

Bei der Untersuchung der linksventrikulären Herzfunktion nahmen das Herzzeitvolumen, die Auswurfraction und das Verkürzungsvermögen der WT-Mäuse unter der Aldo/NaCl-Behandlung gegenüber den WT-Kontrolltieren ab (Abb. 31). Daneben fiel bei den WT/Aldo+NaCl-Tieren eine Zunahme des endsystolischen Kammerdurchmessers auf (Abb. 31). Gegenüber der Kontrolle verschlechterte sich somit die Herzfunktion der WT/Aldo+NaCl-Tiere.

Unter der Aldo/NaCl-Behandlung zeigten die α MHC hMR^{DEF}-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle dagegen keine Veränderungen in der linksventrikulären Funktion oder Dimension (Abb. 31).

Gegenüber den WT/Aldo+NaCl-Mäusen wiesen die α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Tiere ein höheres Herzzeitvolumen auf (Tab. 12). Die Herzfunktion der WT-Tiere war unter der Aldo/NaCl-Behandlung somit auch gegenüber den α MHC hMR^{DEF}/Aldo+NaCl-Mäusen vermindert.

5.6 Schlussfolgerung und klinische Relevanz

Wie bereits erwähnt, ist die chronische Herzinsuffizienz eine der häufigsten Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt 2015). An ihrer Pathogenese sind zahlreiche Faktoren und Prozesse beteiligt, wobei vor allem kardiale Umbauprozesse und Veränderungen in der Erregungsleitung, an denen der Mineralokortikoidrezeptor (MR) beteiligt zu sein scheint, eine wichtige Rolle spielen (Fuller and Young 2005, Fuller et al. 2012, Ouvrard-Pascaud et al. 2005, Pitt et al. 1999, 2003, Reil et al. 2012). Weitestgehend unklar ist jedoch, über welche Mechanismen der MR die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigt. Möglicherweise sind dabei sowohl genomische als auch nichtgenomische MR-Effekte von Bedeutung.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden daher die kardialen nichtgenomischen Effekte des MR mittels einer neu generierten Mauslinie *in vivo* untersucht. Das neue Mausmodell exprimierte dabei eine trunkierte Form des menschlichen MR im Herzen, welche nur noch die Ligandenbindedomäne enthielt und daher keine genomischen Effekte vermitteln konnte (hMR^{DEF}) (Grossmann et al. 2008). Mittels einer zweiten Mauslinie, die im Herzen die vollständige Form des menschlichen MR exprimierte (hMR) konnten die genomischen gegenüber den nichtgenomischen MR-Effekten *in vivo* identifiziert werden.

Die hMR-Mäuse wiesen dabei eine erhöhte Mortalität sowie ein profibrotisches, prohypertrophes und proinflammatorisches mRNA-Expressionsmuster und eine gesteigerte mRNA-Expression des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*) auf. Daneben war die myokardiale Masse, abhängig von der Dauer der Aktivität des genomischen MR-Signalwegs, erhöht. Somit konnte die bereits beschriebene Beteiligung der genomischen MR-Effekte an kardialen Umbauprozessen und die genomisch-vermittelte Letalität bestätigt werden (Le Menuet et al. 2001, Lothar et al. 2011, Nguyen Dinh Cat and Jaisser 2012, Ouvrard-Pascaud et al. 2005, Pitt et al. 1999, 2003, Usher et al. 2010).

Mit der α MHC hMR^{DEF}-Linie stand zum ersten Mal ein *in vivo*-Modell zur Untersuchung der kardialen nichtgenomischen MR-Effekte zur Verfügung. Bei diesen transgenen Tieren war über den gesamten Untersuchungszeitraum dagegen keine erhöhte Sterblichkeit zu beobachten. Es zeigte sich außerdem, dass der hMR^{DEF} selbst keine prohypertrophen, profibrotischen oder proinflammatorische Effekte besaß, aber, möglicherweise über zytosolische Signalkaskaden z.B. via PKC, MAPK oder den EGFR (Grossmann et al. 2005, Grossmann and Gekle 2008, Grossmann et al. May 2010), die kardiale Transkription des endogenen MR beeinflusste und somit kardiales Remodeling durch Modulation des genomischen MR-Signalweg begünstigte.

Bei pathologischer Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs durch ein unphysiologisches Aldo/NaCl-Verhältnis war eine reduzierte Transkription der α -Untereinheit (*Kcnh2*) des spannungsabhängigen Kaliumkanals (hERG) und der α -Isoform der schweren Myosinkette (α MHC) zu beobachten. Die verminderte *Kcnh2*-mRNA-Expression könnte dabei zu einer verringerten Offenwahrscheinlichkeit des hERG-Kaliumkanals geführt haben, was eine verlängert kardiale Repolarisation und somit das Auftreten von Arrhythmien begünstigt hätte (Levine et al. 2008). Tatsächlich war die gesamte intraventrikuläre Erregungsleitung der hMR^{DEF}-Tiere unter der Aldo/NaCl-Behandlung verlängert, wodurch die Vermutung bekräftigt wurde, dass der nichtgenomische MR-Signalweg durch Modulation der kardialen Erregungsleitung ebenfalls an der Pathogenese einer Herzinsuffizienz beteiligt ist.

Des Weiteren könnte der nichtgenomische MR-Signalweg durch den Einfluss auf die kardiale α MHC-mRNA-Expression an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sein. Die verminderte α MHC-Transkription könnte dabei zu einer reduzierten Expression des α -Myosinproteins führen, wodurch es zur Verschiebung des Myosinisoenzym-Musters wie im volumenbelasteten, hypertrophen Herzen kommen könnte (Gulick et al. 1991, Ng et al. 1991, Lyons et al. 1990, Morkin 2000, Nakao et al. 1997). Bei kardialer Hypertrophie wird die

Myosinisoform mit der geringeren ATPase-Aktivität (β MHC) verstärkt exprimiert, wodurch die Kontraktionskraft des Herzens reduziert ist (Morkin 2000, Nakao et al. 1997, Warkman et al. 2012). β MHC stellt dabei die bei Mäusen fetal-aktive Form der schweren Myosinkette dar. Somit könnte durch eine pathologische Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs, wie bei einer kardialen Volumenbelastung, die Transkription fetaler Gene induziert werden (Lyons et al. 1990, Morkin 2000).

Abbildung 32 fasst schematisch die möglichen nichtgenomischen Effekte des MR *in vivo* zusammen.

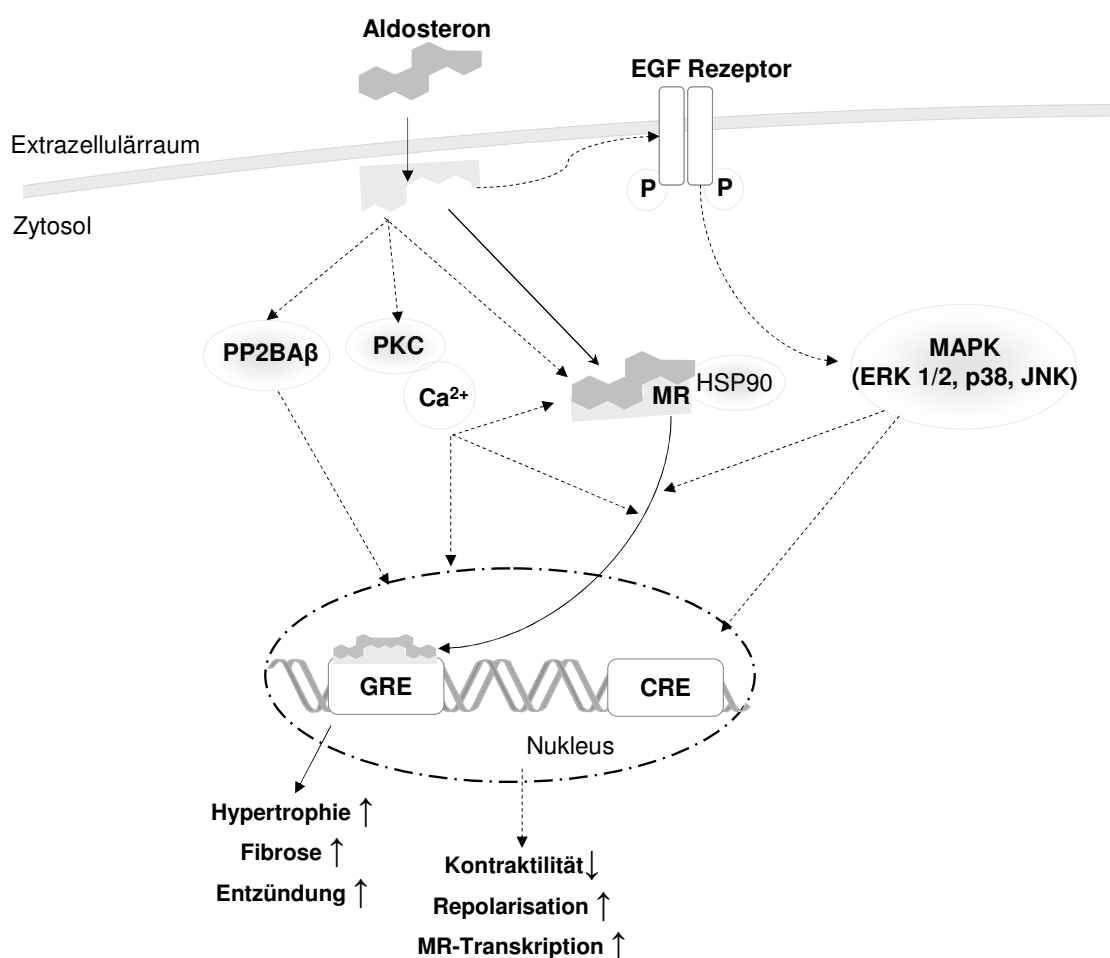


Abb. 32: Kardiale Effekte des nichtgenomischen MR-Signalwegs *in vivo*. Die pathologische Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs beeinflusst die kardiale Kontraktilität und Erregungsleitung, wodurch die Entwicklung einer Herzinsuffizienz begünstigt wird. Daneben fördert der nichtgenomische MR-Signalweg durch Modulation des genomischen MR-Signalwegs prohypertrophen, profibrotischen sowie proinflammatorische Prozesse und könnte auf diesem Weg auch an kardialen Umbauprozessen beteiligt sein (modifiziert nach Grossmann und Gekle 2012).

Diese Ergebnisse legen somit die Vermutung nahe, dass auch der nichtgenomische MR-Signalweg an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt ist. Eine pathologische Aktivierung dieses Signalwegs beeinflusst demnach sowohl die kardiale Kontraktilität als auch die Erregungsleitung im Herzen und begünstigt somit ebenfalls die Pathogenese einer Herzinsuffizienz. Über eine Modulation des genomischen MR-Signalwegs fördert der nichtgenomische MR-Signalweg außerdem prohypertrophen, profibrotischen sowie proinflammatorische Prozesse und könnte auf diesem Weg auch am kardialen Remodeling beteiligt sein.

Aufgrund der hier dargestellten Daten ist es daher sehr wahrscheinlich, dass der Nutzen der Aldosteron-Antagonisten im Rahmen der Pharmakotherapie der systolischen Herzinsuffizienz nicht nur auf der Inhibition einer genomisch-vermittelten Fibrosierung dieser Therapie beruht (Pitt et al. 1999, 2003, Zannad et al. 2011). Möglicherweise ist die verminderte Mortalität unter der Behandlung mit Aldosteron-Antagonisten ebenfalls auf eine Blockierung der nichtgenomischen MR-Effekte zurückzuführen, durch die die kardiale Kontraktion verbessert und das elektrische Remodeling im Herzen verhindert wird.

Geht man davon aus, dass der nichtgenomische MR-Signalweg Herzrhythmusstörungen begünstigt, so wäre es möglich, dass mit den in der Standard-Therapie verwendeten β -Blocker (McMurray et al. 2012) die nichtgenomischen MR-Effekte behandelt werden. Somit stellen der nichtgenomische MR-Signalweg und seine zytosolischen Signalkaskaden neue viel versprechende Zielstrukturen für die pharmakologische Forschung dar. Arzneimittel, die gezielt in die Signalkaskade des nichtgenomischen MR-Signalwegs eingreifen, könnten helfen die Pharmakotherapie der systolischen Herzinsuffizienz zu optimieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dabei nicht untersucht werden, wodurch es bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu einer pathologischen Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs kommt. Vermutlich spielen dabei der Aldosteron- und/oder der Natriumchlorid-Plasmaspiegel eine wichtige Rolle. Denkbar wäre jedoch auch, dass die Aktivierung des nichtgenomischen Signalwegs bei einer Mutation des MR unabhängig von der Aldosteron- bzw. NaCl-Plasmakonzentration ist. Dies würde erklären, warum die Mortalität bei den Patienten der groß angelegten klinischen Studien RALES und EPHEsus unter der Behandlung mit Aldosteron-Antagonisten abnahm, obwohl keine erhöhten Aldosteron-Plasmaspiegel festgestellt werden konnten (Pitt et al. 1999, 2003).

Um die Pathogenese einer systolischen Herzinsuffizienz besser verstehen zu können bzw. deren Therapie weiter zu optimieren, ist es somit wichtig, den kardialen nichtgenomischen MR-Signalweg genauer zu untersuchen.

Weiterhin ist nicht bekannt, über welche zytosolischen Signalkaskaden der nichtgenomische MR-Signalweg die kardiale Transkription beeinflusst. Aufschluss darüber könnten weitere Transfektionversuche *in vitro* geben, die den Einfluss des nichtgenomischen MR-Signalwegs auf die Transkription in Zellen untersuchen, bei denen der MR endogen bereits vorhanden ist. Diese Versuche könnten an endothelialen Zelllinien, wie z.B. den Ea hy 926 Zellen oder an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt werden. Daneben könnte an mit hMR^{DEF}-transfizierten Zellen ohne endogenen MR gezielt untersucht werden, über welche zytosolischen Mechanismen der nichtgenomische MR-Signalweg die mRNA-Expression weiterer Gene moduliert.

Untersuchungen der kardialen Protein-Expression und patch clamp-Versuche an isolierten Kardiomyozyten könnten klären, ob die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Veränderungen der kardialen Transkription zu einer veränderten Translation führen bzw. Einfluss auf kardiale Ionenströme haben.

Auch *in vivo* bieten sich weiterführende Untersuchungen an. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Altersgruppen repräsentieren eher eine junge und eine mittelalte Kohorte und zeigten im Vergleich zu WT-Mäusen keine kardialen Funktionsstörungen. Somit wäre es interessant zu wissen, ob sich bei noch älteren hMR^{DEF}-Tieren (z.B. 24 Monate) die beobachteten Änderungen in der kardialen Transkription funktionell manifestieren.

Daneben konnten in der vorliegenden Arbeit nach vierwöchiger Aldo/NaCl-Behandlung der sechs Monate alten Tiere keine Herzinsuffizienz festgestellt werden. Hierbei könnte jedoch das Behandlungsintervall zu kurz bzw. der Behandlungszeitpunkt zu früh gewählt worden sein und bei längerer Behandlung bzw. bei älteren Tieren die erwarteten kardiovaskulären Erkrankungen auftreten. Außerdem wäre es interessant zu überprüfen, ob die hier beobachteten Veränderungen im Herzen nur durch Aldosteron und NaCl hervorgerufen werden oder aber ob ein erhöhter Kortisol-Plasmaspiegel, wie er z.B. bei Stress auftritt, ebenfalls nichtgenomischen MR-Effekte mediiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die kardialen Effekte des nichtgenomischen MR-Signalwegs *in vivo* anhand eines neu generierten, transgenen Mausmodells untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass

- ◆ die kardiomyozyten-spezifische Überexpression des genomischen MR-Signalwegs (hMR) letal ist.
- ◆ die hMR-Mäuse das erwartete profibrotische, prohypertrophe und proinflammatorische mRNA-Expressionsmuster sowie eine gesteigerte mRNA-Expression des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*) im Herzen aufwiesen.
- ◆ die myokardiale Masse, abhängig von der Dauer der Aktivität des genomischen MR-Signalwegs, erhöht war und somit die bereits beschriebene Beteiligung des genomischen MR-Signalwegs an kardialen Umbauprozessen bestätigt werden konnte.
- ◆ der nichtgenomische MR-Signalweg selbst keine prohypertrophen, profibrotischen oder proinflammatorische Effekte besitzt, durch die Modulation des genomischen MR-Signalweg jedoch an kardialen Umbauprozessen beteiligt ist.
- ◆ die pathologische Aktivierung des nichtgenomischen MR-Signalwegs durch ein unphysiologisches Aldosteron/NaCl-Verhältnis die Transkription des α -Myosinisoenzym (α MHC) und der α -Untereinheit des (*Kcnh2*) spannungsabhängigen Kaliumkanals hERG im Herzen der transgenen Mäuse vermindert, wodurch die kardiale Kontraktilität reduziert bzw. die kardiale Erregungsleitung beeinflusst wird.

Schlussfolgernd begünstigen sowohl der genomische als auch der nichtgenomische MR-Signalweg *in vivo* die Pathogenese kardialer Erkrankungen. Der genomische Signalweg fördert den kardialen Umbau sowie entzündlicher Prozesse. Der nichtgenomische MR-Signalweg vermindert die kardiale Kontraktilität und führt zu einer verlängerten Repolarisation, außerdem begünstigt er kardiale Hypertrophie, Fibrose und Entzündung durch Modulation des genomischen MR-Signalwegs.

Literaturverzeichnis

- Alzamora R, Michea L and Marusic ET (2000). Role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 35, 1099-1104.
- Arbab-Zadeh A, Dijk E, Prasad A, Fu Q, Torres P, Zhang R, Thomas JD, Palmer D and Levine BD (2004). Effect of aging and physical activity on left ventricular compliance. *Circulation*. 110(13):1799-805.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE and Evans RM (1987). Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* Jul 17;237(4812):268-75.
- Aurigemma GP and Gaasch WH (2004). Clinical practice. Diastolic heart failure. *N Engl J Med*. 351(11):1097-105.
- Barbato JC, Mulrow PJ, Shapiro JI and Franco-Saenz R (2002). Rapid effects of aldosterone and spironolactone in the isolated working rat heart. *Hypertension* 40:130-135.
- Barletta F, Wong CW, McNally C, Komm BS, Katzenellenbogen B and Cheskis BJ (2004). Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc. *Mol. Endocrinol*. 18, 1096-1108.
- Beesley AH, Hornby D and White SJ (1998). Regulation of distal nephron K⁺-channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney. *J. Physiol. (Lond.)* 509, 629-634.
- Beggah AT, Escoubet E, Puttini S, Cailmail S, Delage V, Ouvrard- Pascaud A, Bocchi B, Peuchmaur M, Delcayre C, Farman N and Jaisser F (2002). Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14;99(10):7160-5.
- Bénitah JP, Perrier E, Gómez AM and Vassort G (2001). Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes. *Journal of Physiology* 537.1, 151-160.
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R and Schutz G (1998). Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9424-9.
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Greger R and Schutz G (2000). Mineralocorticoid receptor knockout mice: lessons on Na⁺ metabolism. *Kidney Int* 57, 1295-8.
- Bergmann MW and Zelarayan L (2009). RALT specifically halts maladaptive cardiac hypertrophy: a new kid on the block. *Hypertension* 53: 454-455.
- Bhalla V, Willis S and Maisel AS (2004). B-Type Natriuretic Peptide: The Level and the Drug-Partners in the Diagnosis and Management of Congestive Heart Failure. *Congestive Heart Failure*. Volume 10, Issue Supplement s1, 3-27.
- Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D and Cole TJ (2001). The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology* 142, 1587-94.

- Binart N, Lombès M and Baulieu EE (1995). Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants. *Biochem J* 311 (Pt 3), 797-804.
- Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML and McMahon EG (2003). Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int.* 63, 1791-1800.
- Bonow R, Mann D, Zipes D and Libby P (2012). *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 9th Edition. Elsevier/Saunders, Philadelphia, S. 487.
- Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT and Edwards DP (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol. Cell* 8,269-280.
- Borg TK and Caulfield JB (1981). The collagen matrix of the heart. *Fed Proc.*;40:2037-2041.
- Briet M and Schiffrin EL (2010). Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol.* May;6(5):261-73.
- Brilla CG and Weber KT (1992). Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.* 120, 893-901.
- Brilla CG, Matsubara LS and Weber KT (1993). Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25, 563-575.
- Brilla CG, Zhou G, Matsubara L and Weber KT (1994). Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* Jul; 26(7):809-20.
- Brugada J, Brugada R and Brugada P (2007). Channelopathies: a new category of diseases causing sudden death. *Herz*;32(3):185-91.
- Buchwalow IB and Boecker W (2010). *Immunohistochemistry: Basics and Methods*, 1st Edition ed. Heidelberg, Dordrecht, London, New York: Springer.
- Buchwalow I, Samoilova V, Boecker W and Tiemann M (2011). Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Sci Rep* 1, 28, DOI:101038/srep00028.
- Caballero R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E and Tamargo J (2003). Spironolacton and its main metabolite canrenoic acid block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 107, 889-895.
- Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M and Zennaro MC (2007). Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 21:2185-194.
- Caprio M, Antelmi A, Chetrite G, Muscat A, Mammi C, Marzolla V, Fabbri A, Zennaro MC and Fève B (2011). Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology* 152:113-125.

- Chambliss KL, Simon L, Yuhanna IS, Mineo C and Shaul PW (2005). Dissecting the basis of nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estradiol: role of ERalpha domains with known nuclear functions. *Mol. Endocrinol.* 19, 277-289.
- Chavey WE II, Blaum CS, Bleske BE, van Harrison R, Kesterson S and Nicklas JM (2001, Part I). Guideline for the Management of Heart Failure Caused by Systolic Dysfunction: Part I. Guideline Development, Etiology and Diagnosis. *Am Fam Physician.* 64(5):769-774.
- Chavey WE II, Blaum CS, Bleske BE, van Harrison R, Kesterson S and Nicklas JM (2001, Part II). Guideline for the Management of Heart Failure Caused by Systolic Dysfunction: Part II. Treatment. *Am Fam Physician.* 64(6):1045-1055.
- Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F and Pearce D (1999). Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2514-2519.
- Christ M, Douwes K, Eisen C, Bechtner G, Theisen K and Wehling M (1995). Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25:117-123.
- Cohn JA (1996). The management of chronic heart failure. *N. Engl. J. Med.* 335, 490-498.
- Colucci WS (1990). In vivo studies of myocardial beta-adrenergic receptor pharmacology in patients with congestive heart failure. *Circulation* 82 (2 Suppl):I44-51.
- Dube P and Weber KT (2011). Congestive heart failure: pathophysiologic consequences of neurohormonal activation and the potential for recovery: part I. *Am J Med Sci.* 342(5):348-51.
- Edwards CRW, Burt D, McIntyre MA, Dekloet ER, Stewart PM, Brett L, Sutanto WS and Nibder C (1988). Localisation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 2:986-989.
- Engvall E, Ruoslahti E and Miller EJ (1978). Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *The Journal of Experimental Medicine* 147 (6): 1584-1595.
- Farman N, Maubec E, Poeggeler B, Klatter JE, Jaisser F and Paus R (2010). The mineralocorticoid receptor as a novel player in skin biology: beyond the renal horizon? *Exp Dermatol* 19:100-107.
- Fink W und Haidinger G (2007). Die Häufigkeit von Gesundheitsstörungen in 10 Jahren Allgemeinpraxis. *Z. Allg. Med.* 83 (2000), S. 102-108. Zitiert nach Womit sich Hausärzte hauptsächlich beschäftigen. *MMW-Fortschr. Med.* Nr. 16 (149. Jg.).
- Flurkey K, Curren JM and Harrison DE (2007). *Mouse Models in Aging Research. The Mouse in Biomedical Research (Second Edition), Volume III, Pages 637-672.*
- Fortmüller L (2004). Elektrophysiologische und echokardiographische Phänotypisierung A1 und A3 Adenosinrezeptor überexprimierender Mäuse. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Fracarollo D, Berger S, Galuppo P, Kneitz S, Hein L, Schütz G, Frantz S, Ertl G and Bauersachs J (2011). Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 123:400-408.

- Fuller PJ and Young MJ (2005). Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 46 1227-1235.
- Fuller PJ, Yao Y, Yang J and Young MJ (2012). Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *Journal of Endocrinology* 213, 15-24.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R and Smith AI (1988). Mineralocorticoid action: target-tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242:583-585.
- Funder JW (2009). Reconsidering the Roles of the Mineralocorticoid Receptor. *Hypertension* 53 (part 2):286-290.
- Funder JW (2010). Minireview: Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors: Past, Present, and Future. *Endocrinology* 151: 5098–5102.
- Funder JW (2012). Aldosterone and mineralocorticoid receptors: A personal reflection. *Molecular and Cellular Endocrinology* 350, 146–150.
- Ganong WF and Mulrow PJ (1958). Rate of change in sodium and potassium excretion after injection of aldosterone into the aorta and renal artery of the dog. *Am J Physiol* 195:337-342.
- Gekle M, Golenhofen N, Oberleithner H and Silbernagl S (1996). Rapid activation of Na⁺/H⁺-exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca²⁺ and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10500-10504.
- Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S, Schenk K, Marschitz I and Schramek H (2001). Rapid activation of Na⁺/H⁺-exchange in MDCK-cells by aldosterone involves MAP-kinases ERK1/2. *Pflügers Arch.* 441, 781-786.
- Goldbarg AN, Hellerstein HK, Bruell JH and Daroczy AF (1968). Electrocardiogram of the normal mouse, *Mus musculus*: general considerations and genetic aspects. *Cardiovasc Res* 2:93-99.
- Gómez R, Nunes L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J and Delpón E (2005). Spironolacton and its main metabolite canrenoic acid block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1+mink channels. *British journal of pharmacology* 146, 146-161.
- Gomez-Sanchez EP (2011). Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: minority rule? *Trends Endocrinol Metab* 22:179-187.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA and Ruddle FH (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 7380-7384.
- Gottlieb SS, McCarter RJ and Vogel RA (1998). Effect of beta-blockade on mortality among high-risk and low-risk patients after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 339, 489-497.
- Greenwood AK, Butler PC, White RB, DeMarco U, Pearce D and Fernald RD (2003). Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology* 144, 4226-36.
- Grinnell F (1984). Fibronectin and wound healing. *J. Cell Biochem* 26 (2): 107-116.

- Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Krug AW and Gekle M (2004). Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F1226-F1231.
- Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B and Gekle M (2005). Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol. Endocrinol.* 19, 1697-1710.
- Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K and Gekle M (2007). Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1790-E1800.
- Grossmann C and Gekle M (2008). Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. *steroids* 73 973-978.
- Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Husse B and Gekle M. EF domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions. *J. Biol. Chem.* 283, 7109-7116 (2008).
- Grossmann C and Gekle M (2009). New aspects of rapid aldosterone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 308 53-62.
- Grossmann C, Husse B, Mildenerger S, Schreier B, Schuman K, Gekle M (May 2010). Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803 584-590.
- Grossmann C, Wuttke M, Ruhs S, Seiferth A, Mildenerger S, Rabe S, Schwerdt G and Gekle M (June 2010). Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation. *FASEB J* 24: 6 2010-2019.
- Gulick J, Subramaniam A, Neumann J and Robbins J (1991). Isolation and Characterization of the Mouse Cardiac Myosin Heavy Chain Genes. *J Biol Chem* 266: 9180-9185.
- GV-Solas, Anästhesie und Analgesie, Ausschuss für Anästhesie (2013). <http://www.gv-solas.de/index.php?id=33> (abgerufen am 13.01.15).
- Harvey BJ, Doolan CM, Condliffe SB, Renard C, Alzamora R and Urbach V (2002). Nongenomic convergent and divergent signalling of rapid responses to aldosterone and estradiol in mammalian colon. *Steroids* 67, 483-491.
- Hasenfuß G, Anker S, Bauersachs J, Böhm M, Hoppe UC, Pieske B, von Scheidt W and Wachter R (2013). Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Behandlung der akuten und chronischen Herzinsuffizienz. *Kardiologie* 7:105–114 DOI 10.1007/s12181-013-0491-6.
- Hayashi H, Kobara M, Abe MK, Tanaka N, Gouda E, Toba H, Yamada H, Tatsumi T, Nakata T and Matsubara H (2008). Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens. Res.* 31, 363-375.
- Hernández-Díaz I, Giraldez T, ArnauMR, Smits VA, Jaisser F, Farman N and Alvarez de la Rosa D (2010). The mineralocorticoid receptor is a constitutive nuclear factor in cardiomyocytes due to hyperactive nuclear localization signals. *Endocrinology*; 151:3888-3899.

- Hodgson ZG, Meddle SL, Roberts ML, Buchanan KL, Evans MR, Metzdorf R, Gahr M and Healy SD (2007). Spatial ability is impaired and hippocampal mineralocorticoid receptor mRNA expression reduced in zebra finches (*Taeniopygia guttata*) selected for acute high corticosterone response to stress. *Proc Biol Sci* 274, 239-45.
- Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA and Erdmann E (2005). Guidelines for therapy of chronic heart failure. *Z Kardiol.* 94(8):488-509.
- Horisberger JD, Lemas V, Kraehenbuhl JP and Rossier BC (1991). Structure-function relationship of Na/K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 53, 565-84.
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH et al. (2009) 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* 119:391-479.
- Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C and Rappaport L (2000). The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Fail Rev* 5:239–250.
- Jaffe IZ, Newfell BG, Aronovitz M, Mohammad NN, McGraw AP, Perreault RE, Carmeliet P, Ehsan A and Mendelsohn ME (2010). Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice. *J Clin Invest* 120:3891-3900.
- Jessup M and Brozena S (2003). Heart failure. *N Engl J Med.* 348(20):2007-18.
- Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ and Shah AM (2006). Aldosterone mediates angiotensinII-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J* 20:1546-1548.
- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP and Gold PW (1992). Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev.* 16(2):115-30.
- Karavidas A, Lazaros G, Tsiachris D and Pyrgakis V (2010). Aging and the cardiovascular system. *Hellenic J Cardiol.* 51(5):421-7.
- Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A and Esler MD (1995). Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 26:1257-1263.
- Kobayashi N, Yoshida K, Nakano S, Ohno T, Honda T, Tsubokou Y and Matsuoka H (2006). Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Hypertension* 47:671-679.
- Koelling TM, Aaronson KD, Cody RJ et al. (2002). Prognostic significance of mitral regurgitation and tricuspid regurgitation in patients with left ventricular systolic dysfunction. *Am Heart J.*144(3):524-9.
- Kolla V and Litwack G (2000). Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biochem.* 204, 35-40.
- Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D and Schaper J (2000). The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev* 5:271–280.

- Krozowski ZS and Funder JW (1983). Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:6056-6060.
- Krug AW, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildemberger S, Govindan MV and Gekle M (2003). Aldosterone Stimulates Epidermal Growth Factor Receptor Expression. *Journal of biological chemistry* Vol. 278, No. 44, 43060-43066.
- Krug AW, Kopprasch S, Ziegler CG, Dippong S, Catar RA, Bornstein SR, Morawietz H and Gekle M (2007). Aldosterone rapidly induces leukocyte adhesion to endothelial cells: a new link between aldosterone and arteriosclerosis? *Hypertension* 50:156-157.
- Krug AW, Allenhöfer L, Monticone R, Spinetti G, Gekle M, Wang M and Lakatta EG (2010). Elevated mineralocorticoid receptor activity in aged rat vascular smooth muscle cells promotes a proinflammatory phenotype via extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase and epidermal growth factor receptor-dependent pathways. *Hypertension* 55 1476-1483.
- Kumar R and Thompson EB (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64 (5): 310-9.
- Lakatta EG and Sollot SJ (2002). Review: Perspectives on mammalian cardiovascular aging: humans to molecules. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 132: 699-721.
- Lakatta EG (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation* 107: 490-497.
- Lalevée N, Rebsamen MC, Barrère-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Bénitah JP and Rossier MF (2005). Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* Aug 1;67(2):216-24.
- Latouche C, Sainte-Marie Y, Steenman M, Castro Chaves P, Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G, Farman N and Jaisser F (2010). Molecular Signature of Mineralo-corticoid Receptor Signaling in Cardiomyocytes: From Cultured Cells to Mouse Heart. *Endocrinology*, 151(9):4467-4476.
- Le Menuet D, Isnard R, Bichara M, Viengchareun S, Muffat-Joly M, Walker F, Zennaro MC and Lombès M (2001). Alteration of cardiac and renal functions in transgenic mice overexpressing human mineralocorticoid receptor *J Biol Chem* 276, 38911-20.
- Levine E, Rosero SZ, Budzikowski AS, Moss AJ, Zareba W and Daubert JP (2008). Congenital long QT syndrome: considerations for primary care physicians. *Cleve Clin J Med* 75 (8): 591-600.
- Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB and Ho KK (1996). The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 275:1557–1562.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C(t)$) Method. *Methods* 25:402-408.
- Lombès M, Oblin ME, Gasc JM, Baulieu EE, Farman N and Bonvalet JP (1992). Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor. *Circ Res* 71:503-510.

- Loriaux DL, Menard R, Taylor A, Pita JC and Santen R (1976). Spironolactone and Endocrine Dysfunction. *Ann Intern Med.*;85(5):630-636.
- Lothar A, Berger S, Gilsbach R, Rösner S, Ecke A, Barreto F, Bauersachs J, Schütz G and Hein L (2011). Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function after chronic pressure overload. *Hypertension* 57:746-754.
- Louridas GE and Lourida KG (2012). Systems biology and biomechanical model of heart failure. *Curr Cardiol Rev.* 8(3):220-30.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Luchner A, Holmer St, Schunkert H und Riegger GA (2003). Bedeutung der Herzinsuffizienzmarker BNP und NT-proBNP für die Klinik. *Dtsch Arztebl* 100: A 3314-3321.
- Lyons GE, Schiaffino St, Sassoon D, Barton P and Buckingham M (1990). Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *The Journal of Cell Biology*, Volume 111 No. 6, Pt. 1, 2427-2436.
- Maguire D, O'Sullivan G and Harvey BJ (1995). Membrane and genomic mechanisms for aldosterone effect in human colon. *Surg Forum* 80:195-197.
- Marney AM and Brown NJ (2007). Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci (Lond)* 113:267-278.
- Mathew JT, Patni H, Chaudhary AN, Liang W, Gupta A, Chander PN, Ding G and Singhal PC (2008). Aldosterone induces mesangial cell apoptosis both in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* 295, F73-F81.
- McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, et al (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail.*14(8):803-69.
- Mihailidou AS, Mardini M and Funder JW (2004). Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C. *Endocrinology* 145, 773-780.
- Mihailidou AS, Loan Le TY, Mardini M and Funder JW (2009). Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. *Hypertension* 54:1306-1312.
- Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME and Mourad JJ (Apr 2005). Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*; 45:1243-1248.
- Milliez P, Deangelis N, Rucker-Martin C, Leenhardt A, Vicaut E, Robidel E, Beaufrils P, Delcayre C and Hatem SN (Sept 2005). Spironolactone reduces fibrosis of dilated atria during heart failure in rats with myocardial infarction. *Eur Heart J* 26:2193-2199.
- Mitchell GF, Jeron A and Koren G (1998). Measurement of heart rate and Q-T interval in the conscious mouse. *Am. J. Physiol.* 274 (Heart Circ. Physiol. 43): H747-H751.

- Miyata Y, Muto S and Kusano E (2005a). Mechanisms for nongenomic and genomic effects of aldosterone on Na^+/H^+ exchange in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* 12, 2237-2250.
- Miyata K, Rahman M, Shokoji T, Nagai Y, Zhang GX, Sun GP, Kimura S, Yukimura T, Kiyomoto H, Kohno M et al. (2005b). Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2906-2912.
- Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Kaneda Y, Ogihara T and Dzau VJ (1994). Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest* 94:978-984.
- Morkin E (2000). Control of Cardiac Myosin Heavy Chain Gene Expression. *Microscopy research and technique.*
- Moura AM and Worcel M (1984). Direct action of aldosterone on transmembrane ^{22}Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* 6, 425-430.
- Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR and Leinwand LA (1997). Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest.* Nov 1, 100(9): 2362-2370.
- Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW and Khaw BA (1996). Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335(16):1182–1189.
- Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R und Erbel R (2009). Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte. In: *Dtsch Arztebl Int.* 106 (16), S. 269-275.
- Newfell BG, Iyer LK, Mohammad NN, McGraw AP, Ehsan A, Rosano G, Huang PL, Mendelsohn ME and Jaffe IZ (2011). Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1871-1880.
- Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A and Robbins J (1991). Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circ. Res.* 68;1742-1750.
- Nguyen Dinh Cat A, Griol-Charhbili V, Loufrani L, Labat C, Benjamin L, Farman N, Lacolley P, Henrion D and Jaisser F (2010). The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J* 24:2454-2463.
- Nguyen Dinh Cat A, Briones AM, Callera GE, Yogi A, He Y, Montezano AC and Touyz RM (2011). Adipocyte-derived factors regulate vascular smooth muscle cells through mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Hypertension* 58:479-488.
- Nguyen Dinh Cat A and Jaisser F (2012). Extrarenal effects of aldosterone. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21:147-156.
- Nishi M and Kawata M (2007). Dynamics of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor: implications from live cell imaging studies. *Neuroendocrinology.*85(3):186-92.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97(2):161-163.

- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimune Y (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 407 313-319.
- Ouvrard-Pascaud A, Puttini S, Sainte-Marie Y, Athman R, Fontaine V, Cluzeaud F, Farman N, Rafestin-Oblin ME, Blot-Chabaud M and Jaisser F (2004). Conditional gene expression in renal collecting duct epithelial cells: use of the inducible Cre-lox system. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286, F180-F187.
- Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Benitah JP, Perrier R, Soukaseum C, Nguyen Dinh Cat A, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Demolombe S, Mechta-Grigoriou F, Beggah AT, Maison-Blanche P, Oblin ME, Delcayre C, Fishman GI, Farman N, Escoubet B and Jaisser F (2005). Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation* 111:3025-3033.
- Packer M, Coats AJ, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK and DeMets DL (2001, Carvedilol Prospective Randomized Cumulative Survival Study Group). Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 344(22):1651-8.
- Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB and Ndebele K (2014). The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflam.* Volume 2014, Article ID 689360, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/689360>
- Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, Splawski I, Timothy KW, Priori SG, Napolitano C and Bloise R (Initial Posting: February 15, 2006; Last Update: April 21, 2011). Timothy Syndrome Synonym: Long QT Syndrome with Syndactyly, Long QT Syndrome 8. *GeneReviews*[®] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1403/> (abgerufen am 06.01.2015)).
- Pankov R and Yamada KM (October 2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 115 (Pt 20): 3861-3.
- Patel PD, Sherman TG, Goldman DJ and Watson SJ (1989). Molecular cloning of a mineralocorticoid (type I) receptor complementary DNA from rat hippocampus. *Mol Endocrinol* 3, 1877-85.
- Patel PD, Lopez JF, Lyons DM, Burke S, Wallace M and Schatzberg AF (2000). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res* 34, 383-92.
- Paulus WJ, Tschope C, Sanderson JE et al. (2007) How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 28: 2539-2550.
- Pauschinger M, Knopf D, Petschauer S, Doerner A, Poller W, Schwimmbeck PL, Kühl U and Schultheiss HP (1999). Dilated cardiomyopathy is associated with significant changes in collagen type I/III ratio. *Circulation.* Jun 1;99(21):2750-6.
- Pearce P and Funder JW (1987). High affinity aldosterone binding sites (type 1 receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 14:859–866.
- Pearce D and Kleyman TR (2007). Salt, sodium channels and SGK-1. *J Clin Invest* 117:592-595.

- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K and Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22(2):153-83.
- Perrier R, Richard S, Sainte-Marie Y, Rossier BC, Jaisser F, Hummler E and Bénitah JP (2005). A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac L-type Ca^{2+} current in mice. *J Physiol.* Nov 15;569(Pt 1):153-62.
- Pfau A, Grossmann C, Freudinger R, Mildenerberger S, Benesic A and Gekle M (2007). Ca^{2+} but not H_2O_2 modulates GRE-element activation by the human mineralocorticoid receptor in HEK cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 264, 35-43.
- Pfeffer MA, Claggett B, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, John F. Heitner, Lewis EF, O'Meara E, Rouleau JL, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SC, Sweitzer NK, McKinlay SM and Pitt B (2015). Regional Variation in Patients and Outcomes in the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) Trial. *Circulation.* 131(1):34-42
- Pitt B, Zannad F, Remme W, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J and Wittes J (1999). The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators (RALES). *N Engl J Med* 341:709-17.
- Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R and Kleiman J (2003). The EPHESUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther.* Jan;15(1):79-87.
- Porter GA, Bogoroch R and Edelman IS (1964). On the mechanism of action of aldosterone on sodium transport: the role of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 52:1326-1333.
- Porter TE, Ghavam S, Muchow M, Bossis I and Ellestad L (2007). Cloning of partial cDNAs for the chicken glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and characterization of mRNA levels in the anterior pituitary gland during chick embryonic development. *Domest Anim Endocrinol* 33, 226-39.
- Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK and Dickey DM (2009). Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol.* 191 (191): 341-66.
- Pryce CR, Feldon J, Fuchs E, Knuesel I, Oertle T, Sengstag C, Spengler M, Weber E, Weston A and Jongen-Relo A (2005). Postnatal ontogeny of hippocampal expression of the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the common marmoset monkey. *Eur J Neurosci* 21, 1521-35.
- Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EAG, Goellner JJ, Funder JW and McMahon EG (2003). Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* 93, 69-76.
- Reil JC, Hohl M, Selejan S, Lipp P, Drautz F, Kazakow A, Münz BM, Müller P, Steendijk P, Reil GH, Alessie MA, Böhm M and Neuberger HR (2012). Aldosterone promotes atrial fibrillation. *Eur Heart J.* Aug;33(16):2098-108.

- Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ and Young MJ (2009). Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against DOC/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension* 54:537-543.
- Rocha R and Stier CT (2001). Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 12, 308-314.
- Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahon EG and Delyani JA (2002). Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1802-H1810.
- Rossi GP, Sacchetto A, Pavan E, Palatini P, Graniero GR, Canali C and Pessina AC (1997). Remodeling of the left ventricle in primary aldosteronism due to Conn's adenoma. *Circulation* 95, 1471-1478.
- Rossier BC, Pradervand S, Schild L and Hummler E (2002). Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol* 64, 877-97.
- Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM, Judge S, Heo J, Colucci WS, Siwik DA and Sam F (2005). Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 46, 555-561.
- Sambrook J and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sato A, Liu JP and Funder JW (1997). Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes *in vitro*. *Endocrinology* 138:3410-3416.
- Schaefer BC, Schaefer ML, Kappler JW, Marrack P and Kedl RM (2001). Observation of Antigen-Dependent CD8⁺ T-Cell/Dendritic Cell Interactions *in Vivo*. *Cellular Immunology* 214, 110-122.
- Seiferth A, Ruhs S, Mildenerger S, Gekle M and Grossmann C (2012). The phosphatase calcineurin PP2BA β mediates part of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *FASEB J.* 2012 Jun;26(6):2327-37.
- Seiferth, Anja (2013). Analyse des Mineralokortikoid-Rezeptor-Calcineurin-Signalnetzwerkes. Dissertation. Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Semler DE, Chengelis CP and Radzialowski FM (1989). The effects of chronic ingestion of spironolactone on serum thyrotropin and thyroid hormones in the male rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* Apr;98(2):263-8.
- Skøtt O, Uhrenholt TR, Schjerning J, Hansen PBL, Rasmussen LE and Jensen BL (2006). Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease—friend or foe? *Pharmacol. Ther.* 111, 495-507.
- Stas S, Whaley-Connell A, Habibi J, Appesh L, Hayden MR, Karuparthi PR, Qazi M, Morris EM, Cooper SA, Link CD, Stump C, Hay M, Ferrario C and Sowers JR (2007). Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. *Endocrinology* 148:3773-3780.

Statistisches Bundesamt (abgerufen am 04.01.2015).

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>

Sturm A, Bury N, Dengreville L, Fagart J, Flouriot G, Rafestin-Oblin ME and Prunet P (2005). 11-deoxycorticosterone is a potent agonist of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mineralocorticoid receptor. *Endocrinology* 146, 47-55.

Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT and Weber KT (2002). Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol* 161:1773-1781.

Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, Smiseth OA, Gavazzi A, Haverich A, Hoes A, Jaarsma T, Korewicki J, Levy S, Linde C, Lopez-Sendon JL, Nieminen MS, Pierard L and Remme WJ (2005). Task Force for the Diagnosis and Treatment of chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26:1115-1140.

Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J and Wilhelmsen L (1990). Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 82, 1730-1736.

Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunnings KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT and Overbreek PA (1991). FVB/N: An inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, pp. 2065-2069, Genetics.

Tsai CT, Chiang FT, Tseng CD, Hwang JJ, Kuo KT, Wu CK, Yu CC, Wang YC, Lai LP and Lin JL (2010). Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*; 55:758-770.

Touyz RM and Callera GE (2009). A new look at the eye: aldosterone and mineralocorticoid receptors as novel targets in retinal vasculopathy. *Circ Res* 104:9-11.

Unger T and Li J (2004). The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5 Suppl 1:S7-11.

Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, Lumeng CN and Mortensen RM (2010). Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest* 120:3350-3364.

Valenick LV, Hsia HC, Schwarzbauer JE (September 2005). Fibronectin fragmentation promotes alpha4beta1 integrin-mediated contraction of a fibrin-fibronectin provisional matrix. *Experimental cell research* 309 (1): 48-55.

Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM and Schiffrin EL (2002). Spironolactone improves angiotensin induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* 40:504-510.

Ward MR, Kanellakis P, Ramsey D, Funder J and Bobik A (2001). Eplerenone suppresses constrictive remodeling and collagen accumulation after angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* 104:467-472.

- Warkman AS, Whitman SA, Miller MK, Garriock RJ, Schwach CM, Gregorio CC and Krieg PA (2012). Developmental Expression and Cardiac Transcriptional Regulation of Myh7b, a Third Myosin Heavy Chain in the Vertebrate Heart. *Cytoskeleton* (Hoboken). 69(5):324-35.
- Weber KT (1989). Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.*;13:1637-1652.
- Weil J und Schunkert H (2006). Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin Res Cardiol.* Volume 95, Issue 4 Supplement, 1-17.
- WHO
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> (abgerufen am 04.01.2015).
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html> (abgerufen am 05.01.2015).
- Williams GH and Dluhy RG (1972). Aldosterone biosynthesis. Interrelationship of regulatory factors. *Am J Med.* 53(5):595-605
- Xing S, Tsaih SW, Yuan R, Svenson KL, Jorgenson LM, So M, Paigen BJ and Korstanje R (2009). Genetic influence on electrocardiogram time intervals and heart rate in aging mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jun;296(6):H1907-13.
- Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M and Nakao K (1994). Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation.* Jul;90(1):195-203.
- Young M, Fullerton M, Dilley R and Funder JW (1994). Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 93, 2578-83.
- Young M and Funder JW (2003). Mineralocorticoid action and sodium–hydrogen exchange: studies in experimental cardiac fibrosis. *Endocrinology* 144, 3848-3851.
- Yuan J, Jia R and Bao Y (2007). Aldosterone up-regulates production of plasminogen activator inhibitor-1 by renal mesangial cells. *J Biochem Mol Biol* 40, 180-8.
- Zannad F, McMurray JJ, Drexler H, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pitt B (2011). Rationale and design of the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *N Engl J Med*;364:11-21.
- Zhao M, Valamanesh F, Celerier I, Savoldelli M, Jonet L, Jeanny JC, Jaisser F, Farman N and Behar-Cohen F (2010). The neuroretina is a novel mineralocorticoid target: aldosterone up-regulates ion and water channels in Müller glial cells. *FASEB J*; 24:3405-3415.

Veröffentlichungen

Publikationen

Winter S, Schreier B, Gergs U, Grossmann C, Rabe S, Schulitz J, Buchwalow IB, Gekle M, Neumann J (2015). Pathological activation of the nongenomic mineralocorticoid receptor signaling pathway decreases transcription of Myh6 and Kcnh2 in the transgenic mouse heart. EMBO Journal (eingereicht).

Schreier B, Rabe S, Winter S, Ruhs S, Mildenerger S, Schneider B, Sibilica M, Gotthardt M, Kempe S, Mäder K, Grossmann C, Gekle M (2014). Moderate inappropriately high aldosterone/NaCl constellation in mice: cardiovascular effects and the role of cardiovascular epidermal growth factor receptor. Sci Rep. 4:7430.

Vorträge und Poster mit veröffentlichtem Abstract

Winter S, Schreier B, Gergs U, Grossmann C, Gekle M, Neumann J (2012). The nongenomic effects of the mineralocorticoid receptor in transgenic mouse heart. 78th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., Dresden, Germany. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385 (Suppl. 1): 104.

Winter S, Gergs U, Grossmann C, Gekle M, Neumann J (2011). On the pathophysiological role of mineralocorticoid receptors in the mouse heart. 77th Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., Frankfurt a. M., Germany. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 383 (Suppl. 1): 23.

Vorträge und Poster ohne veröffentlichten Abstract

Winter S, Schreier B, Grossmann C, Gergs U, Gekle M, Neumann J (2011). Crosstalk des Mineralokortikoidrezeptors mit dem kardialen CREB/cAMP Signalweg - Part II. FGI Retreat, Wittenberg.

Winter S, Schreier B, Grossmann C, Gergs U, Gekle M, Neumann J (2010). Crosstalk des Mineralokortikoidrezeptors mit dem kardialen CREB/cAMP Signalweg. FGI Retreat, Wittenberg.

Anhang

◆ Puffer und Lösungen

AP-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ * 6 H ₂ O 1,49% (w/v) Triethanolamin pH 9,4
APS-Lösung	40% APS in Aqua dest. Lagerung bei 4 °C
BCIP-Lösung (168 mM)	50 mg BCIP in 1 ml DMF
Blockierungspuffer	50 mM Tris 0,05% Tween 1% Milchpulver Aqua dest pH 7,3
DEPC-H ₂ O	0,2% (w/v) DEPC in Aqua dest. über Nacht durch Rühren gemischt autoklavieren
Enzymlösung	60 U/ml Kollagenase Typ II 0,5 U/ml Protease Typ XIV in Tyrode
Homogenisierungspuffer	8,5 mM NaHCO ₃ 3,5 % (w/v) SDS
Isoprenalin-Stammlösung 10 mM	3,6 mg Isoprenalin-Bitartrat 5,85 µl 1N HCl Aqua dest. ad 1000 µl Vor Licht geschützt bei -20 °C lagern
Laufpuffer 10 x	250 mM Tris 1920 mM Glycin 1% SDS pH-Wert nicht einstellen
Natriumacetat	3 M Na-Azetat (pH 6,0)
NBT-Lösung (61mM)	50 mg NBT 300 µl Aqua dest. 700 µl DMF
NBT/BCIP-Mischung	66 µl NBT-Lösung (61mM) 33 µl BCIP-Lösung (168 mM) in 10 ml AP-Puffer
Ponceau-Rot-Färbelösung	0,2% (w/v) Ponceau S 3% (w/v) TCA

PBS 1x	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Probenpuffer 2 x	200mM Tris/HCl 6% SDS 20% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 4% 2-Mercaptoethanol pH 8,8 Lagerung bei -20°C
Sammelgel	1500 µl H ₂ O 375 µl Acrylamid 625 µl Sammelgelpuffer (0,5 M Tris/HCl) 25 µl 10% SDS 3,75 µl TEMED 7,5 µl 40% APS
Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl, pH 6,8 (mit 6 M HCl einstellen) Lagerung bei 4°C
SDS-Lösung	10% SDS in Aqua dest.
TAE-Puffer 50 x	2 M Tris/Azetat 5 M Na-Azetat 0,5 M EDTA pH 7,8
TBST 10 x	10 mM Tris-Base 154 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20 pH 7,4 Lagerung bei 4°C
TE/SDS-Puffer	50 mM Tris/HCl 100 mM EDTA 0,5% (w/v) SDS pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 0,25 mM EDTA pH 8,0
Transferpuffer	210 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 40 M NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
Trenngel 6%	4125 µl H ₂ O 1500 µl Acrylamid 1875 µl Trenngelpuffer 75 µl 10% SDS 12,5 µl TEMED 6,25 µl 40% APS

Trenngel 10%	3125 μ l H ₂ O 2500 μ l Acrylamid 1875 μ l Trenngelpuffer (1,5 M Tris/HCl) 75 μ l 10% SDS 12,5 μ l TEMED 6,25 μ l 40% APS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (mit 6 M HCl einstellen) Lagerung bei 4°C
Tyrode	14 mM NaCl 5 mM Glucose 10 mM HEPES 20 mM BDM 5,4 mM KCl

◆ Mineralokortikoidrezeptor-Gensequenz (NM 000901.2)

hMR: 215-3169
hMR^{DEF}: 2261-3169

```

1  cgggagccaa  cttcaggctg  ctacagaggaa  gcccggtgcag  tcagtcacct  gggtgcaaga
61  gcggttctgc  ctccgggctct  cccgctgcag  ggagagcggc  actcgctggc  ctggatgtgg
121  ttggatttag  gggggctccg  cagcaggggt  ttcgtggcgg  tggcaagcgc  tgcaacaggt
181  agacggcgag  agacggaccc  cggccgaggc  agggatggag  accaaaggct  accacagtct
241  ccctgaaggt  ctagatatgg  aaagacgggt  ggggtcaagtt  tctcaggctg  tggagcgttc
301  ttccctggga  cctacagaga  ggaccgatga  gaataactac  atggagattg  tcaacgtaag
361  ctgtgtttcc  ggtgctattc  caaacaacag  tactcaagga  agcagcaaaag  aaaaacaaga
421  actactccct  tgccttcagc  aagacaataa  tcggcctggg  attttaacat  ctgatattaa
481  aactgagctg  gaatctaagg  aactttcagc  aactgtagct  gagtccatgg  gtttatatat
541  ggattctgta  agagatgctg  actattccta  tgagcagcag  aaccaacaag  gaagcatgag
601  tccagctaag  atttatcaga  atggtgaaca  gctggtgaaa  ttttacaag  gaaatggcca
661  tcgtccttcc  actctaagtt  gtgtgaacac  gcccttgaga  tcatttatgt  ctgactctgg
721  gagctccgtg  aatgggtggc  tcatgcgcgc  cattgttaaa  agccctatca  tgtgtcatga
781  gaaaagcccg  tctgtttgca  gccctctgaa  catgacatct  tcggtttgca  gccctgctgg
841  aatcaactct  gtgtcctcca  ccacagccag  ctttggcagt  tttccagtgc  acagcccaat
901  caccagggga  actcctctga  catgctcccc  taatgctgaa  aatcgaggct  ccaggtcgca
961  cagccctgca  catgctagca  atgtgggctc  tcctctctca  agtccgttaa  gtagcatgaa
1021  atcctcaatt  tccagccctc  caagtcactg  cagtgtaaaa  tctccagtct  ccagtcccaa
1081  taatgtcact  ctgagatcct  ctgtgtctag  ccctgcaaat  attaacaact  caaggtgctc
1141  tgtttccagc  ccttcgaaca  ctaataacag  atccacgctt  tccagtccgg  cagccagtac
1201  tgtgggatct  atctgtagcc  ctgtaaaaa  tgccttcagc  tacactgctt  ctggcacctc
1261  tgctggatcc  agtacattgc  gggatgtggt  tcccagtcca  gacacgcagg  agaaaagggtc
1321  tcaagaggtc  ccttttcta  agactgagga  agtagagagt  gccatctcaa  atggtgtgac
1381  tggccagctt  aatattgtcc  agtacataaa  accagaacca  gatggagctt  ttagcagctc
1441  atgtctagga  ggaaatagca  aaataaatc  ggattcttca  ttctcagtac  caataaagca
1501  agaatcaacc  aagcattcat  gttcaggcac  ctcttttaa  gggaatcaa  cagtaaacct
1561  gtttccattt  atggatggct  cgtatttttc  ctttatggat  gataaagact  attattccct
1621  atcaggaatt  ttaggaccac  ctgtgcccgg  ctttgatgg  aactgtgaag  ccagcggatt
1681  cccagtgggt  attaacaag  aaccagatga  cgggagctat  taccagagg  ccagcatccc
1741  ttcctctgct  attggtgggg  tgaattcagg  tggacagtcc  ttccactaca  ggattgggtc
1801  tcaaggtaca  atatctttat  cacgatcggc  tagagaccaa  tctttccaac  acctgagttc
1861  ctttctcct  gtcaataact  tagtggagtc  atggaaatca  cacggcgacc  tgtcgtctag
1921  aagaagtgat  gggtatccgg  tcttagaata  cattccagaa  aatgtatcaa  gctctacttt
1981  acgaagtgtt  tctactggat  cttcaagacc  ttcaaaaata  tgtttgggtg  gtggggatga
2041  ggcttcagga  tgccattatg  gggtagtcac  ctgtggcagc  tgcaaagttt  tcttcaaaag
2101  agcagtggaa  gggcaacaca  actatttatg  tgctggaaga  aatgattgca  tcattgataa
2161  gattcgacga  aagaattgtc  ctgcttgca  acttcagaaa  tgtcttcaag  ctggaatgaa
2221  tttaggagca  cgaaagtcaa  agaagttggg  aaagttaaaa  gggattcacg  aggagcagcc
2281  acagcagcag  cagccccac  cccaccccc  acccccgcaa  agcccagagg  aagggacaac
2341  gtacatcgct  cctgcaaaaag  aacctcgggt  caacacagca  ctggttcctc  agctctccac
2401  aatctcacga  gcgctcacac  cttccccgt  tatggctcct  gaaaacattg  aacctgaaat
2461  tgtatatgca  ggctatgaca  gtcaaaacc  agatacagcc  gaaaatctgc  tctccagct
2521  caaccgctta  gcaggcaaac  agatgatcca  agtcgtgaag  tgggcaaagg  tacttccagg
2581  atttaaaaac  ttgctcttg  aggacaaat  taccctaate  cagtattcct  ggtatgtct
2641  atcatcattt  gccttgagct  ggagatcgta  caacatac  aacagccaat  ttctctattt
2701  tgcaccagac  ctagtcttta  atgaagagaa  gatgcatcag  tctgccaatg  atgaactatg
2761  ccaggggatg  caccaaatca  gccttcagtt  cgttcgactg  cagctcacct  ttgaagaata
2821  caccatcatg  aaagttttgc  tgctactaag  cacaattcca  aaggatggcc  tcaaaagcca
2881  ggctgcattt  gaagaaatga  ggacaaatta  catcaaagaa  ctgaggaaga  tggtaactaa
2941  gtgtcccaac  aattctgggc  agagctggca  gaggttctac  caactgacca  agctgctgga
3001  ctccatgcat  gacctgggtg  gogacctgct  ggaattctgc  ttctacacct  tccgagagtc
3061  ccatgcgctg  aaggtagagt  tccccgcaat  gctgggtggg  atcatcagcg  accagctgcc
3121  caaggtggag  tcggggaacg  ccaagccgct  ctacttccac  cggaagtgac  tgcccgctgc
3181  ccagaagaac  tttgccttaa  gtttccctgt  gttgttccac  acccagaagg  acccaagaaa

```


3241 acctgttttt aacatgtgat ggttgattca cacttgttca acagtttctc aagtttaaag
3301 tcatgtcaga ggtttggagc cgggaaagct gttttccggt ggatttggcg agaccagagc
3361 agtctgaagg attccccacc tccaatcccc cagcgcttag aaacatgttc ctgttcctcg
3421 ggatgaaaag ccatatctag tcaataactc tgattttgat attttcacag atggaagaag
3481 ttttaactat gccgtgtagt ttctgggtatc gttcgcttgt tttaaaaggg ttcaaggact
3541 aacgaacggt ttaaagctta cccttgggtt gcacataaaa cgtatagtca atatggggca
3601 ttaatattct tttgttatta aaaaaacaca aaaaaataat aaaaaaatat atacagattc
3661 ctgttgtgta ataacagaac tcgtggcgtg gggcagcagc tgcctctgag ccctcgctcg
3721 tccacggctc tctgcatcac tggatatacac actcgttagc gtccatttct tatttaatta
3781 gaatgataa gatgatgta aatgccttgg tttgatttct agtatctatt gtgttggctt
3841 taaaataat tttttgcagt cttttgctgt gctgtacatt actgtatgta taaattatga
3901 aggacctgaa ataaggata aggatctttt gtaaatagaga cacatacaaaa aaaaatcttt
3961 aatgggtaat aggatgaatg ggaaagtatt tttgaaagaa ttctattttg ctggagacta
4021 ttttaagtact atctttgtct aaacaaggta attttttttt gtaaagtgca atgtcctgca
4081 tgcataatga accgtttaca gtgtatttaa gaaagggaaa gctgtgcctt ttttagcttc
4141 atatctaatt taccattatt ttacagtctc tgttgtaa at aaccacactg aaacctcttc
4201 ggttgtcttg aaacctttct actttttctg tactttttgt tttgttcttg gtctcccgct
4261 tggggcattt gtgggactcc agcacgtttt ctggcttctg cttcatcctg ctccatcggg
4321 gaatgacaca ctgcggtgct tgcagctcct ggaagggtgc atttgacaac acatgtggga
4381 gaggaggctc ttggagtgtc gcagctttgg gaaagcctgc ctcgtttccc ttttcctcta
4441 gaagcagaac cagctctacg agagtggagc tgggaacttg atggctcaga gagcatcttt
4501 tcctcccatt ttagaaaatc agattttctc ctgtgggaaa aaaaaattcc atgcaactctc
4561 tctctgttaa agatcagcta ttcccttctg atcttggaaa gaggttctgc actcctggaa
4621 ccggtcacag gaacgcacag atcatggcag gatgcgctgg gacggcccat cttggcaagg
4681 ttcagtctga atggcatgga gaccgggaga tagaggggtt ttagattttt aaaaggtagg
4741 ttttaaaaat aagttttata cataaacagt tttggagaaa aattacagat catataagca
4801 agacagtggc actaaaatgt ttaattcatt aatctgtttg tttggcactg atgcaatgta
4861 tggcttttct cttgccccaa atcacaaaaca tatgtatctt tggggaaact aacaatatga
4921 ttgcaactaaa taaactactt tgaatagagg ccaaattaat cttttaaaaa tgatgataat
4981 catcagggtt actcagtgaa atcatattaa ttattttcca aaatctaaaa gctgtagctg
5041 gagaagccca tggccacgag gaagcagcaa ttaattagat caacactttt ctccagggtt
5101 caccatgcag gcaacattac cttgtctttc aaaagacacc tgccttagtg caaggggaaa
5161 cctgtgaaag ctgcaactcag agggaggagt ctttcttaca taatttgcaa tttcaggaat
5221 ttaatttata ggcagatctt taaatacagt caacttacgg tgcacagtaa tatgaaagcc
5281 acactttgaa ggttaataaat acacagcatg cagactggga gttgctagca aacaaatggc
5341 ttacttacia aagcagcttt tagttcagac ttagttttta taaaatgaga attctgactt
5401 acttaaccag gtttgggatg gagatggtct gcatcagctt tttgtattaa caaagtact
5461 ggctctttgt gtgtctccag gtaactttgc ttgattaaac agcaaagcca tattctaaat
5521 tcaactgttg atgcctgtcc cagtccaaat tgtctgtctg ctcttatfff tgtaccatat
5581 tgctcttaaa aatcttgggt tggtagagtt cataattcac caaaaagttc atataattta
5641 aagaaacact aaattagttt aaaatgaagc aatttatatc tttatgcaaa aacatatgtc
5701 tgtctttgca aaggactgta agcagattac aataaatcct ttacttt

◆ **Protokolle und Primer**

Primer	Sequenz	Temperatur
Primer _{for} (Bgl II Schnittstelle)	5'- <u>agatct</u> gggattcacgaggagcag-3'	55 °C
Primer _{back} (Hind III Schnittstelle)	5'- <u>aagctt</u> cacttccggtggaagtaga-3'	

Tab. 13: Primer hMR^{DEF} CDS (Produktlänge 921 bp).

Substanzen	Menge	Endkonzentration
10x QIAGEN PCR Puffer	5 µl	1 x
5 x Q-Solution	10 µl	1 x
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl	200 µM
Forward-Primer (10 µM)	variabel	0,1-0,5 µM
Reverse-Primer (10 µM)	variabel	0,1-0,5 µM
Taq DNA-Polymerase	0,5 µl	2,5 U/Reaktion
DEPC-H ₂ O	variabel	
DNA	variabel	≤ 1 µg/Reaktion
Endvolumen	50 µl	

Tab. 14: Pipettierschema für hMR^{DEF} CDS.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	1 min	34
Annealing	55 °C	1 min	
Extension	72 °C	1 min	
Finale Extension	72 °C	10 min	
hold	8 °C		1

Tab. 15: PCR Programm für hMR^{DEF} CDS.

Substanzen	Menge
10 x Ligationspuffer	1 µl
pCR® 2.1 Vektor	x µl (50 ng)
hMR ^{DEF} Fragment	x µl (100 ng)
T4 DNA Ligase	4 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Inkubation über Nacht bei 14 °C

Tab. 16: Pipettierschema für Ligation des PCR Produkts in den pCR® 2.1 Vektor.

Substanzen	Menge
DNA	x µl (1 µg)
Enzympuffer (Buffer NEB2)	2,5 µl
Bgl II	2,0 µl
Hind III	2,0 µl
DEPC-H ₂ O	ad 25 µl

Inkubation 2 Stunden bei 37°C

Tab. 17: Pipettierschema für Restriktion mit Bgl II und Hind III.

Substanzen	Menge
10 x Ligationspuffer	1 µl
pEGFP-C1	x µl (50 ng)
hMR ^{DEF} Fragment	x µl (100 ng)
T4 DNA Ligase	4 µl
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl

Inkubation über Nacht bei 14°C

Tab. 18: Pipettierschema für Ligation des Restriktion-Produkts in den peGFP-C1 Vektor.

Primer	Sequenz	Temperatur
MHC-SEQ-P1	5'-acccttaccacacatagacc-3'	60°C
hMR-E-Seg-rev_II	5'-attgcggggaactctacctt-3'	

Tab. 19 : Primer für die Genotypisierung der transgenen Mauslinien.

Substanzen	Menge	Endkonzentration
DNA (0,2-0,4µg/µl)	1 µl	0,2 - 0,4 µg
10x DreamTaq Puffer	5 µl	1 x
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl	200 µM
Forward-Primer	0,5 µl	1 µM
Reverse-Primer	0,5 µl	1 µM
DreamTaq DNA-Polymerase (5 u/µl)	0,3 µl	1,5 U
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl	

Tab. 20: Pipettierschema für die Genotypisierung der transgenen Mauslinien.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	} 34
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	3:30 min	
Finale Extension	72°C	10 min	1

Tab. 21: PCR-Programm für die Genotypisierung der αMHC hMR-Linie.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	30 sec	} 29
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	2 min	
Finale Extension	72°C	6 min	1

Tab. 22: PCR-Programm für Genotypisierung der α MHC hMR^{DEF}-Linie.

Substanzen	Mengen
RNA (1 μ g) + DEPC-H ₂ O	8 μ l
10x Reaktionspuffer	1 μ l
DNase I	1 μ l
→ auf Eis pipettieren	
→ Inkubation bei 37°C für 10 min, dann auf Eis stellen	
Stopp-Lösung (50 mM EDTA)	1 μ l
dNTP Mix (10 mM)	2 μ l
→ Inkubation bei 25°C für 10 min, dann auf Eis stellen	
DEPC-H ₂ O	1 μ l
Finales Volumen	16 μ l

Tab. 23: Pipettierschema für DNA-Verdau mit DNase I (NEB).

Substanzen	Mengen
Total RNA (50 ng)	1,5 μ l
Random hexamer Primer (0.2 μ g/ μ l)	1 μ l
DEPC-H ₂ O	9,5 μ l
→ Inkubation bei 70°C für 5 min	
5 x Reaktionspuffer	4 μ l
RiboLock TM Ribonuclease Inhibitor (20 u/ μ l)	1 μ l
dNTP Mix (10 mM)	2 μ l
→ Inkubation bei 25°C für 5 min	
RevertAid TM H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/ μ l)	1 μ l
Finales Volumen	20 μ l
→ Inkubation erst bei 25°C für 10 min, dann bei 42°C für 60 min	
→ Zum Stoppen der Reaktion 10 min auf 70°C erhitzen	

Tab. 24: Protokoll für die Reverse Transkription (RT).

Primer	Sequenz	Temperatur
hMR-P4	5'-gaaattgtatatgcaggcta-3'	60 °C
hMR-PCR-P1R	5'-tgcagtcgaacgaactgaag-3'	

Tab. 25 Primer für Reverse Transkription-PCR.

Substanzen	Menge	Endkonzentration
cDNA	2 µl	
10x DreamTaq Puffer	5 µl	1 x
dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	1 µl	200 µM
hMR-P4	0,5 µl	1 µM
hMR-PCR-P1R	0,5 µl	1 µM
DreamTaq DNA-Polymerase (5 u/µl)	0,3 µl	1,5 U
DEPC-H ₂ O	ad 50 µl	

Tab. 26: Pipettierschema für RT-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	} 29
Annealing	60 °C	30 sec	
Extension	72 °C	30 sec	
Finale Extension	72 °C	5 min	1

Tab. 27: Programm für RT-PCR.

Substanzen	+RT	-RT
Templet (aus DNase Verdau)	12 µl	4 µl
Random hexamer Primer (0.2 µg/µl)	1 µl	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	-	1,5 µl
→ Inkubation bei 70 °C für 5 min		
5 x Reaktionspuffer	4,2 µl	2 µl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 u/µl)	1 µl	0,5 µl
dNTP Mix (10 mM)	2 µl	1 µl
→ Inkubation bei 25 °C für 5 min		
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/µl)	1 µl	-
Finales Volumen	21,2 µl	9,5 µl
→ Inkubation erst bei 25 °C für 10 min, dann bei 42 °C für 60 min		
→ Zum Stoppen der Reaktion 10 min auf 70 °C erhitzen		

Tab. 28: Protokoll für Reverse Transkription für qPCR (+RT und -RT).

Substanzen	Menge
2x SuperMix	6,25 µl
Sense Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Antisense Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Template	1 µl
Rox Farbstoff	0,025 µl
DEPC-H ₂ O	4,225 µl

Tab. 29: Pipettierschema für qPCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	39
Annealing	57-64 °C	30 sec	
Extension	72 °C	30 sec	
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
<i>Schmelzkurve</i>	95 °C	1 min	
	60 °C	30 sec	
	95 °C	30 sec	

Tab. 30: Programm für qPCR.

◆ Ergänzende Daten:

Zwölf Monate alte α MHC hMR⁺-Mäuse (Bis zum sechsten Lebensmonat wurden die Tiere mit Kaliumcanrenoat behandelt, anschließend erhielten diese Tiere über weitere sechs Monate reines Leitungswasser bei Bedarf).

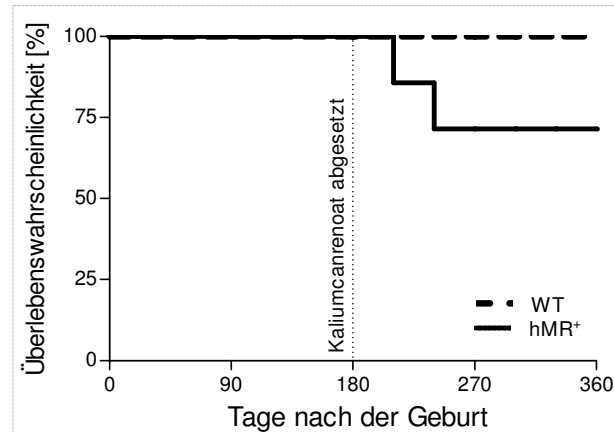


Abb. 33: Kaplan-Meier Statistik. Dargestellt ist die Überlebenswahrscheinlichkeit von zwölf Monate alten α MHC hMR⁺- und WT-Tieren. $p > 0,05$ gegenüber WT, $n = 6$ bis 75 .

	Zwölf Monate			
	WT	hMR	hMR ⁺	hMR ^{DEF}
Körpergewicht (g)	32,0 ± 1,7	26,9 ± 1,1 [#]	28,8 ± 1,7	31,1 ± 1,5
Herzgewicht (mg)	158,1 ± 5,9	139,8 ± 7,9	177,1 ± 21,1	138,7 ± 6,9 [#]
Relatives Herzgewicht (mg/g)	4,9 ± 0,2	5,1 ± 0,3	6,1 ± 0,5 [#]	4,5 ± 0,2

Tab. 31: Morphologische Parameter. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM des Körpergewichts, Herzgewichts und relativen Herzgewichts von zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR⁻, α MHC hMR⁺- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren. [#] $p < 0,05$ gegenüber WT mit zwölf Monaten, $n = 4$ bis 9 .

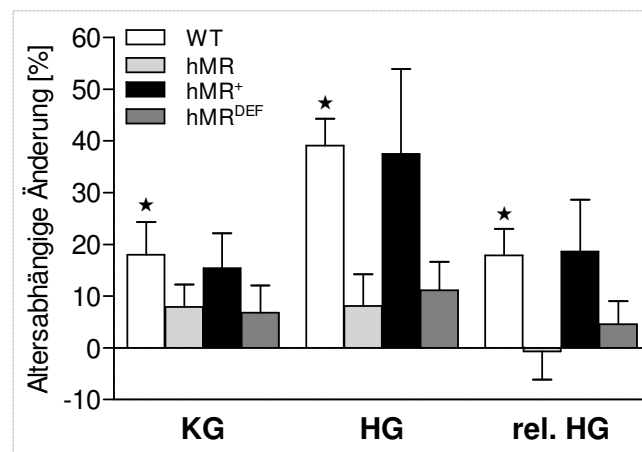


Abb. 34: Altersabhängige Änderung der morphologischen Parameter. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der prozentualen Änderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. * $p < 0,05$ gegenüber der entsprechenden Kontrolle mit sechs Monaten, $n = 4$ bis 9 pro Gruppe.

	Zwölf Monate		
	hMR	hMR ⁺	hMR ^{DEF}
$\Delta\text{Ct } eGFP$	11,9 ± 0,5	11,9 ± 0,3	8,1 ± 0,2

Tab. 32: Ergebnisse der mRNA-Expression für *eGFP*. ΔCt -Mittelwerte \pm SEM ermittelt durch qPCR für die *eGFP* mRNA-Expression von zwölf Monate alten $\alpha\text{MHC hMR}^-$, $\alpha\text{MHC hMR}^+$ - und $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Mäusen. $p < 0,05$ $\alpha\text{MHC hMR}^-$, $\alpha\text{MHC hMR}^+$ - gegenüber $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Mäusen, $n = 4$ bis 9.

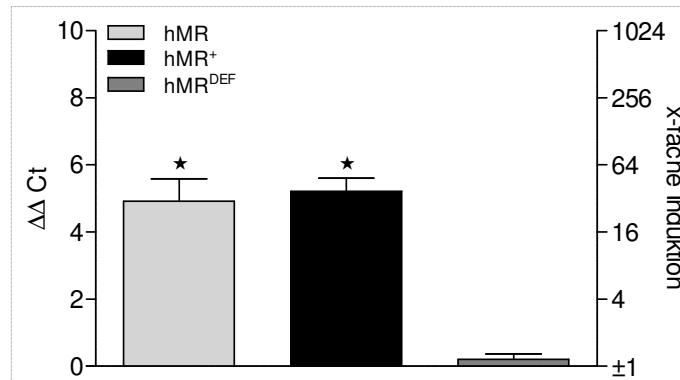


Abb. 35: Ergebnisse der mRNA-Expression für *Nr3c2*. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta\text{Ct}$, x-fache Induktion) für *Nr3c2* bei $\alpha\text{MHC hMR}^-$, $\alpha\text{MHC hMR}^+$ - und $\alpha\text{MHC hMR}^{\text{DEF}}$ -Mäusen im Vergleich zur kardialen WT-mRNA-Expression mit zwölf Monaten. $\star p < 0,05$ gegenüber WT, $n = 4 - 9$ pro Gruppe.

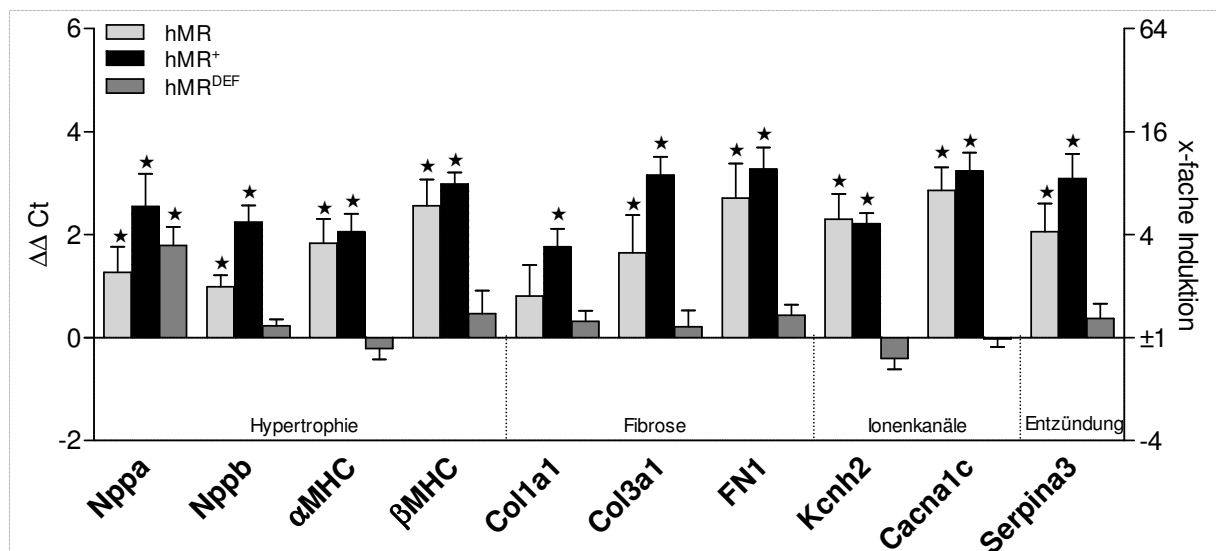


Abb. 36: Ergebnisse der Untersuchung der kardialen Transkription. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta Ct$, x-fache Induktion) von zwölf Monaten alten αMHC hMR⁻, αMHC hMR⁺- und αMHC hMR^{DEF}-Mäusen im Vergleich zur kardialen WT-mRNA-Expression. * $p < 0,05$ gegenüber WT mit zwölf Monaten, $n = 4$ bis 9 pro Gruppe.

Natriuretisches Peptid Typ A und B (*Nppa*, *Nppb*), Myosinisoform α und β (αMHC , βMHC), $\alpha 1$ -Untereinheit des Kollagens vom Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col3a1*), Fibronectin 1 (*Fn1*), α -Untereinheit des hERG-Kaliumkanals (*Kcnh2*), α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*), Serinpeptidase Inhibitor/Akut-Phase-Protein (*Serpina3*).

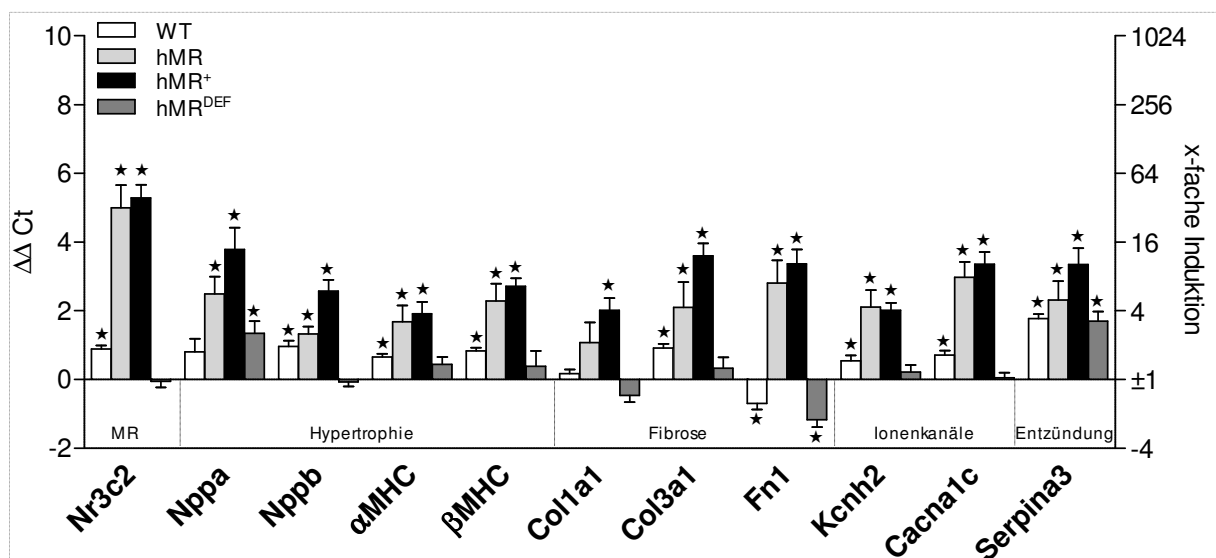


Abb. 37: Ergebnisse der altersabhängigen Untersuchung der kardialen Transkription. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der Änderungen der relativen mRNA-Expression ($\Delta\Delta Ct$, x-fache Induktion) zwischen sechs und zwölf Monate alten αMHC hMR⁻ und αMHC hMR⁺-Herzen. * $p < 0,05$ gegenüber der sechs Monate alten Kontrolle, $n = 4$ bis 9 pro Gruppe.

Natriuretisches Peptid Typ A und B (*Nppa*, *Nppb*), Myosinisoform α und β (αMHC , βMHC), $\alpha 1$ -Untereinheit des Kollagens vom Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col3a1*), Fibronectin 1 (*Fn1*), α -Untereinheit des hERG-Kaliumkanals (*Kcnh2*), α -Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (*Cacna1c*), Serinpeptidase Inhibitor/Akut-Phase-Protein (*Serpina3*).

	Zwölf Monate			
	WT	hMR	hMR ⁺	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	362,0 ± 36,5	295,0 ± 17,4	292,3 ± 28,3	412,4 ± 40,5
RR-Intervall (ms)	180,6 ± 19,2	207,0 ± 12,7	209,3 ± 10,8	164,4 ± 24,6
PR-Intervall (ms)	34,9 ± 1,3	31,9 ± 0,5	36,2 ± 2,8	34,2 ± 1,1
P-Welle (ms)	13,3 ± 0,8	13,8 ± 0,8	12,0 ± 1,7	12,7 ± 0,8
QRS-Komplex (ms)	15,5 ± 0,7	13,2 ± 0,3 [#]	14,5 ± 0,5	15,8 ± 0,8
QT-Intervall (ms)	28,6 ± 1,4	31,6 ± 2,3	32,5 ± 3,3	29,3 ± 2,0
QT _c -Intervall (ms)	65,5 ± 4,1	69,4 ± 3,9	72,4 ± 10,5	75,0 ± 5,6

Tab. 33: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der EKG-Aufzeichnungen von zwölf Monate alten WT-, αMHC hMR-, αMHC hMR⁺- und αMHC hMR^{DEF}-Tieren. [#]p < 0,05 gegenüber WT mit zwölf Monaten, n = 4 bis 9.

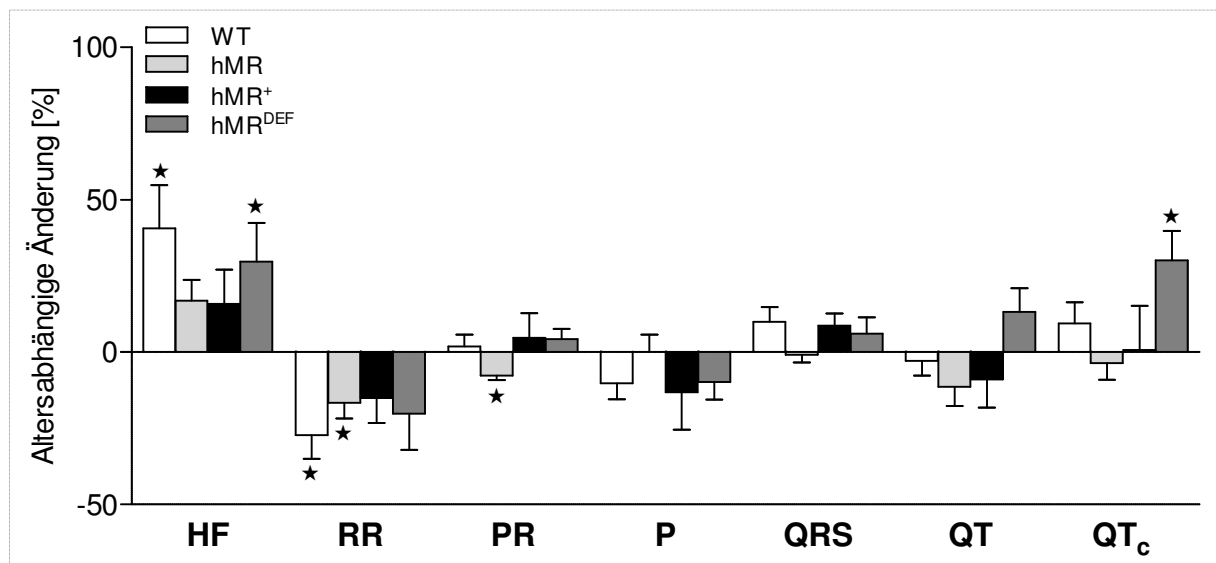


Abb. 38: Ergebnisse der altersabhängigen elektrokardiographischen Untersuchung. Graphische Darstellung der Mittelwerte ± SEM der prozentualen Änderung zwischen sechs und zwölf Monate alten WT-, αMHC hMR-, αMHC hMR⁺- und αMHC hMR^{DEF}-Mäusen. *p < 0,05 gegenüber der sechs Monate alten Kontrolle, n = 4 bis 9 pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Abstand zwischen zwei Herzschlägen (RR), Dauer der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (PR), Dauer der intraatrialen (P) und der intraventrikulären Erregungsausbreitung (QRS), Dauer der gesamten intraventrikulären Erregung (QT, frequenzkorrigiert = QT_c).

	Zwölf Monate			
	WT	hMR	hMR ⁺	hMR ^{DEF}
Herzfrequenz (bpm)	511,3 ± 19,3	564,7 ± 14,4 [#]	520,8 ± 4,9	514,9 ± 18,6
RR-Intervall (ms)	118,7 ± 4,6	106,6 ± 2,6 [#]	115,2 ± 1,1	118,1 ± 5,4
PR-Intervall (ms)	34,0 ± 1,5	31,5 ± 1,0	36,3 ± 3,6	32,7 ± 1,2
P-Welle (ms)	11,8 ± 0,8	10,0 ± 0,4	11,0 ± 0,8	11,8 ± 0,5
QRS-Komplex (ms)	15,4 ± 0,7	13,2 ± 0,5 [#]	14,3 ± 0,9	16,2 ± 0,7
QT-Intervall (ms)	26,4 ± 1,4	27,0 ± 1,2	28,8 ± 2,9	30,7 ± 1,9 [#]
QT _c -Intervall (ms)	80,6 ± 3,1	82,3 ± 3,4	84,3 ± 7,7	89,3 ± 4,9 [#]

Tab. 34: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung unter β -Adrenozeptor-Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der EKG-Aufzeichnungen von zwölf Monaten alten WT-, α MHC hMR-, α MHC hMR⁺- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren im Maximum der β -Adrenozeptor-Stimulation. [#]p < 0,05 gegenüber WT_{ISO} mit zwölf Monaten, n = 4 bis 9.

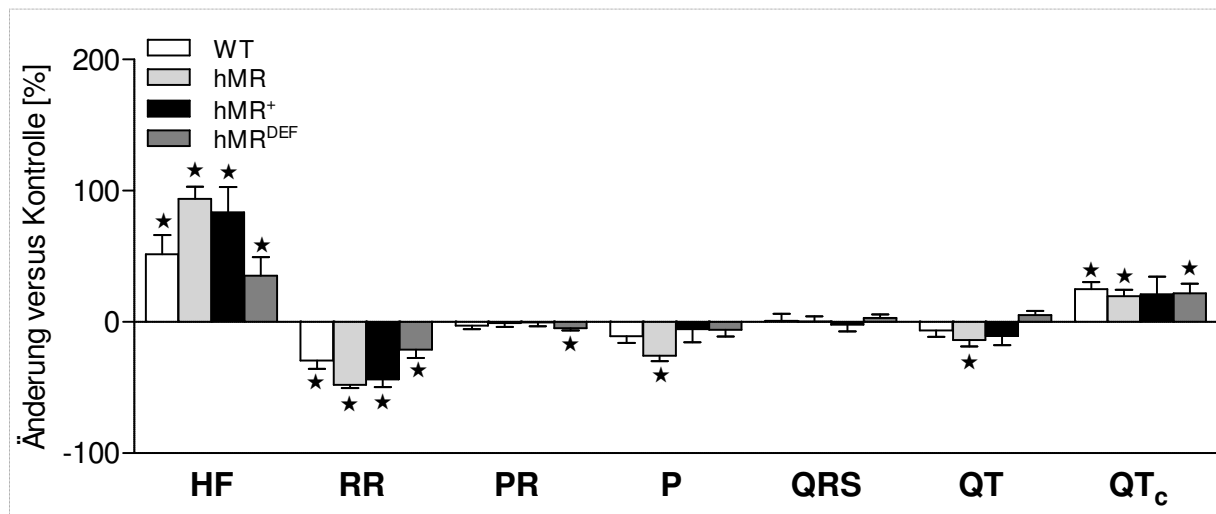


Abb. 39: Ergebnisse der elektrokardiographischen Untersuchung unter β -Adrenozeptor-Stimulation. Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm SEM der prozentualen Änderung zwölf Monate alten WT-, α MHC hMR-, α MHC hMR⁺- und α MHC hMR^{DEF}-Tieren im Maximum der β -Adrenozeptor-Stimulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. *p < 0,05 gegenüber der Kontrolle vor ISO, n = 4 bis 6 pro Gruppe.

Herzfrequenz (HF), Abstand zwischen zwei Herzschlägen (RR), Dauer der atrioventrikulären Erregungsüberleitung (PR), Dauer der intraatrialen (P) und der intraventrikulären Erregungsausbreitung (QRS), Dauer der gesamten intraventrikulären Erregung (QT, frequenzkorrigiert = QT_c).

Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mich während der gesamten Promotionszeit begleitet und motiviert haben.

Prof. Reinhard Neubert danke ich, dass er bereit war die naturwissenschaftlichen Betreuung der Arbeit zu übernehmen sowie für seine Unterstützung bei der Eröffnung und Durchführung des Promotionsverfahrens.

Bei Herrn Prof. Joachim Neumann bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas im Rahmen des Wilhelm-Roux-Forschungsprogramms, für die gute Betreuung sowie sein Interesse am Fortgang der Arbeit. Herrn Dr. Ulrich Gergs danke ich für die für seine Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft. Den Kollegen des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie Halle (Saale) danke ich herzlich für das freundliche Arbeitsklima, ihre fachliche Unterstützung sowie ihre Mithilfe im Labor.

Sehr herzlich möchte ich Herrn Prof. Michael Gekle für seine Unterstützung und seine hilfreichen Kommentare danken.

Herrn Prof. Udo Klöckner und PD Uwe Rückschloss danke ich für ihre Hilfe bei den patch clamp-Versuchen.

Für ihr Interesse und nützlichen Ratschlägen danke ich außerdem Frau Jun. Prof. Claudia Grossmann, Frau Dr. Barbara Schreier und PD Gerald Schwerdt.

Danken möchte ich auch den Kollegen des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie für die herzlich Aufnahme am Institut, die tatkräftige Unterstützung sowie ihre stete Hilfsbereitschaft und das immer offene Ohr.

Herrn Prof. Igor Buchwalow möchte ich für die Unterstützung bei der Erstellung der histologischen und elektronen-mikroskopischen Schnitte danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die großartige Unterstützung, die immer wieder aufgebrauchte Geduld und die Aufmunterungen über die Jahre.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Außerdem habe ich die Satzung der Universität Halle zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades.

Halle (Saale) April 2015

Sabrina Winter

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabrina Winter
Geburtsdatum: 28.09.1981
Geburtsort: Oldenburg (Oldb)

Schulbildung

1995 - 2001 Herbartgymnasium, Oldenburg
Abschluss: Abitur (Note: 2,3)
1992 - 1995 Integrierte Gesamtschule Marschweg, Oldenburg
1988 - 1992 Grundschule auf der Wunderburg, Oldenburg

Studium

10/2012 - heute Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/2006 Approbation: 3. Staatsexamen (Note: 1,5)
10/2001 - 09/2005 Studium der Pharmazie an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: 2. Staatsexamen (Note: 2,0)

Berufliche Laufbahn

10/2012 - 02/2015 HiWi im Julius-Bernstein-Institut für Physiologie,
Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
06/2010 - 07/2013 Apothekerin in der Stephanus-Apotheke, Halle/Saale
06/2009 - 05/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
Pharmakologie und Toxikologie,
Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
05/2008 - 06/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für
experimentelle Neurologie in der Klinik für
Neurologie am Universitätsklinikum Ulm
01/2007 - 05/2008 Apothekerin in der Löwen-Apotheke, Oldenburg
04/2006 - 09/2006 Pharmaziepraktikantin in der Uhlen-Apotheke,
Oldenburg
10/2005 - 03/2006 Pharmaziepraktikantin in der Krankenhausapotheke
der Städtischen Kliniken Oldenburg