

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen
Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Herr Prof. Dr. med. J. Neumann)

**Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit
herzspezifischer Überexpression einer Variante des humanen
Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR^{DEF}) in der Maus**

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

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

von Giso Joachim Schulitz
geboren am 01.05.1983 in Hamburg

Gutachter: Prof. Dr. Joachim Neumann
Prof. Dr. Frank Ulrich Müller
Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann

Eröffnung des Promotionsverfahrens am 10.02.2015
Verteidigung am 17.12.2015

Referat

Aldosteron vermittelt seine Effekte sowohl auf genomischen als auch auf nicht-genomischen Wegen. Um eine Unterscheidung dieses dualen Wirkmechanismus vornehmen zu können, wurde ein transgenes Tiermodell erzeugt. In Mäusen wurde die DNA-Sequenz einer Variante des humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR^{DEF}) unter Kontrolle des α -Myosin heavy chain (α MHC)-Promotors herzspezifisch überexprimiert. Diese DNA-Sequenz sollte ausschließlich nicht-genomische Effekte vermitteln können. Um dies zu erreichen, wurden Rezeptor-Domänen, welche für die Vermittlung genomischer Signalwege essenziell sind (Koaktivatorbindestelle, DNA-Bindedomäne), aus der Sequenz entfernt.

Ein pathophysiologischer Aldosteron-Einfluss auf das kardiovaskuläre System, welcher über nicht-genomische Signalwege vermittelt wird, ist in der Literatur zwar bereits beschrieben worden, jedoch im Vergleich zu genomisch vermittelten Effekten auf das Herz weniger gut untersucht. Es wurden daher im Rahmen von Organbadversuchen Kontraktionsexperimente an elektrisch gereizten linken Vorhöfen und Frequenzmessungen an spontan schlagenden rechten Vorhöfen vorgenommen. Alle Versuche wurden mit transgenen Mäusen (Überexpression des hMR^{DEF}-Konstruktes) und Wildtyp-Geschwistertieren im Vergleich durchgeführt.

Es zeigte sich eine durch Aldosteron induzierte und über nicht-genomische Signalwege vermittelte Abnahme der Kraft (negative Inotropie). Da dieser Effekt sowohl bei transgenen- als auch bei Wildtyp-Mäusen vorhanden war, scheint er von der hMR^{DEF}-Überexpression unabhängig zu sein. Diese Erkenntnisse deuten auf die Beteiligung eines bisher noch wenig erforschten Aldosteron-Rezeptors hin, der in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Des Weiteren konnten bei transgenen Mäusen eine unter Basalbedingungen verlängerte Relaxationszeit linker Vorhöfe sowie im Rahmen von elektrokardiographischen Untersuchungen (EKG) eine verlängerte P-Welle gezeigt werden. Beide Effekte laufen auf genomischem Wege ab und scheinen durch die Überexpression des hMR^{DEF} auf primär nicht-genomischem Wege beeinflusst zu sein (sekundär genomischer Effekt). Einen möglichen Mechanismus für diese Beobachtungen stellt eine verringerte K⁺-Kanalexpression der Vorhöfe dar.

Ein Einfluss von Aldosteron auf die Herzfrequenz konnte nicht gezeigt werden.

Schulitz, Giso Joachim: Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit herzspezifischer Überexpression einer Variante des humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR^{DEF}) in der Maus. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund.....	1
1.2	Funktion und Regulation von Aldosteron	2
1.3	Pathophysiologische Rolle von Aldosteron	3
1.4	Rezeptor und Signalweg.....	5
1.4.1	Primär genomischer Signal-Transduktionsweg.....	5
1.4.2	Primär nicht-genomischer Signal-Transduktionsweg.....	5
1.4.3	Interaktion zwischen genomischem und nicht-genomischem Signalweg.....	7
2	Zielsetzung der Arbeit	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Versuchstiere und Tierhaltung	11
3.2	Herstellung der transgenen Mäuse	11
3.3	Genotypisierung der Mäuse	13
3.3.1	DNA-Isolation.....	13
3.3.2	Konzentrationsmessung der DNA	14
3.3.3	PCR der DNA.....	14
3.3.4	Agarosegelelektrophorese	14
3.4	Histologische Untersuchungen	15
3.5	Kontraktionsversuche	15
3.5.1	Vorbereitung des Organbads	15
3.5.2	Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage.....	16
3.5.3	Präparation der Mäuse.....	17
3.5.4	Präparation der Herzen	18
3.5.5	Versuchsdurchführung und Messprotokolle.....	19
3.6	Elektrokardiographische Untersuchungen (EKG).....	22
3.7	Statistische Auswertung.....	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Genotypisierung der Versuchsmäuse	24
4.2	Histologische Untersuchungen der Herzvorhöfe	25
4.3	Gravimetrie	27
4.4	Untersuchungen an linken Vorhöfen	29
4.4.1	Kontraktionsexperimente mit Ethanol (Lösungsmittelkontrolle).....	29
4.4.2	Kontraktionsexperimente mit Aldosteron	31
4.4.3	Kontraktionsexperimente mit Isoprenalin.....	33

4.4.4	Anspannungs- und Relaxationszeiten	35
4.5	Untersuchungen an rechten Vorhöfen	40
4.5.1	Frequenzmessung unter Aldosteron- und Isoprenalinstimulation	40
4.6	Elektrokardiographische Untersuchungen (EKG).....	42
5	Diskussion	47
5.1	Bisherige Versuchsmodelle	47
5.2	Untersuchung der Kraft.....	48
5.2.1	Nicht-genomischer Weg und beteiligter Rezeptor.....	48
5.2.2	Mögliche Signalkaskade und Zielproteine	49
5.2.3	Beurteilung der Kontraktionsexperimente.....	51
5.3	Untersuchung der Muskelrelaxationszeit	52
5.3.1	Sekundär genomischer Signalweg	52
5.3.2	Möglicher Mechanismus und Zielproteine	53
5.4	Untersuchung der Herzfrequenz	56
5.5	Elektrokardiographische Untersuchungen (EKG).....	57
5.5.1	Analyse der P-Welle.....	57
5.5.2	Analyse der R-Amplitude.....	58
6	Zusammenfassung	59
7	Literaturverzeichnis.....	61
8	Anhang	69
8.1	Puffer und Lösungen	69
8.1.1	Genotypisierung der Versuchstiere	69
8.1.2	Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mäusevorhöfen.....	70
8.2	Verwendete Substanzen.....	70
8.3	Geräte und Bezugsquellen	71
8.4	Primer	72
8.5	PCR-Programm	72
9	Thesen.....	73
	Lebenslauf	i
	Eigenständigkeitserklärung	ii
	Danksagung	iii

Abkürzungsverzeichnis

α MHC	Promotor der schweren Kette des α -Myosins
A/B	Coaktivatorbindestelle des hMR
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
Abb.	Abbildung
Aldo	Aldosteron
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
AT ₁ -Rez.	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
bp	Basenpaare
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
cSRC	Proto-Onkogen Tyrosin-Proteinkinase
D	Scharnierregion des hMR
DAG	1,2-Diacylglycerin
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EGFP	enhanced green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiographie
ENaC	epithelialer Natrium-Kanal
EPHESUS	Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (Effizienz- und Überlebensstudie von Eplerenon bei Myokardinfarkt-bedingter Herzinsuffizienz)
μ g	Mikrogramm
g	Gramm
h	1. human

	2. Stunde
H ⁺	Wasserstoff-Ion
HCN-Kanal	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (Schrittmacherkanal des Sinusknoten)
hMR	humaner Mineralokortikoid-Rezeptor
hMR ^{DEF}	verkürzter humaner Mineralokortikoid-Rezeptor
Hz	Hertz
I _k	Kaliumionenstrom
I _{Na}	Natriumionenstrom
IE	Internationale Einheit
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositoltrisphosphat
i.v.	intravenös
Iso	Isoprenalin
JNK 1/2	c-Jun N-terminale Kinase
K ⁺	Kalium-Ion
Kb	Kilobasen
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
Ktr	Kontrolle
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
μl	Mikroliter
LA	linker Vorhof
Log	Logarithmus
fmol	Femtomol
m	männlich
M	1. molar (Mol/Liter) 2. Männchen
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
MHC	Promotor der schweren Kette des Myosins
min	Minute
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
mm	Millimeter

mM	Millimolar (millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter
NH ₄ ⁺	Ammonium-Ionen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nanomol/Liter)
Nrul	Restriktionsendonuklease
OD	optische Dichte
O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pEC ₅₀	negativer dekadischer Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionen-Konzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
RA	rechter Vorhof
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RALE	randomisierte Aldactone Evaluationsstudie
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
Rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	relaxation time (Relaxationszeit)
s.	siehe
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums

SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Dinatrium-EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)
TET-System	Tetrazyklin-gesteuertes Genregulationssystem
TF	Transkriptionsfaktor
TG	transgene Maus
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	time to peak (Anspannungszeit)
u.a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
Vol-%	Volumenprozent
v.a.	vor allem
vs.	versus, im Vergleich zu
w	weiblich
W	Weibchen
WT	Wildtyp-Maus
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Strukturformel von Aldosteron</i>	3
<i>Abb. 2: Übersicht der verschiedenen Signalwege und Effekte von Aldosteron</i>	9
<i>Abb. 3: Schematische Darstellung der Expressionskassette zur Herstellung transgener Mäuse</i>	12
<i>Abb. 4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionsmessungen</i>	17
<i>Abb. 5: Darstellung der elektrischen Erregungsleitung im Herzen beim Menschen und der Maus</i>	22
<i>Abb. 6: Genotypisierung durch PCR</i>	24
<i>Abb. 7: Fotografien der Fibrosefärbung nach Masson</i>	25
<i>Abb. 8: Immunhistologie zum Nachweis des EGFP („enhanced green fluorescent protein“)</i>	26
<i>Abb. 9: Gravimetrie</i>	28
<i>Abb. 10: Originalmechanogramme elektrisch gereizter linker Vorhöfe</i>	30
<i>Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ethanol (Lösungsmittelkontrolle)</i>	31
<i>Abb. 12: Einfluss von Aldosteron auf die Kontraktionskraft linker Vorhöfe</i>	33
<i>Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin</i>	35
<i>Abb. 14: Schematische Darstellung und Original-Abbildungen von Anspannungs- u. Relaxationszeit einer isometrischen Muskelkontraktion</i>	36
<i>Abb. 15: Anspannungs- und Relaxationszeiten elektrisch gereizter linker Vorhöfe unter Basalbedingungen</i>	37
<i>Abb. 16: Anspannungs- und Relaxationszeiten elektrisch gereizter linker Vorhöfe unter Basalbedingungen, Aldosteron- und Isoprenalinstimulation</i>	39
<i>Abb. 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Aldosteron und Isoprenalin bei spontan schlagenden rechten Vorhöfen</i>	41
<i>Abb. 18: Übersicht der maximalen Schlagfrequenzen spontan schlagender rechter Vorhöfe</i>	42
<i>Abb. 19: Original EKG-Aufnahmen einer Wildtyp-Maus und einer transgenen Maus</i> ...	43
<i>Abb. 20: Auswertung elektrokardiographischer Parameter</i>	45
<i>Abb. 21: Schema von Rezeptor und möglicher Signalkaskade für eine schnelle Kontraktionskraftminderung durch Aldosteron</i>	50
<i>Abb. 22: Schematische Darstellung von Aktionspotential und Muskelkontraktion bei unterschiedlichen Kaliumströmen</i>	54

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Pipettierprotokoll 1</i>	20
<i>Tab. 2: Pipettierprotokoll 2</i>	21
<i>Tab. 3: Weitere elektrokardiographische Parameter:</i>	46

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Das Steroidhormon Aldosteron (Abb. 1) konnte erstmals Anfang der 1950er Jahre isoliert werden (Simpsons et al. 1954). Lange Zeit wurde die Funktion von Aldosteron auf die Kontrolle der Natrium-Rückresorption in der Niere und die Blutdruckregulation beschränkt (Pearce et al. 2003). Diese Regulationsvorgänge wurden als „genomisch“ bezeichnet, da sie auf Transkriptions-Vorgängen beruhten und die Expression verschiedener Gene regulierten. Mittlerweile sind auch Aldosteron-abhängige pathophysiologische Veränderungen anderer Organe bekannt. Hierzu gehören z.B. Entzündungs- und Remodeling-Vorgänge am Herzen, die zu Fibrose, endothelialer Dysfunktion und Hypertrophie führen (Brilla und Weber 1992; Blasi et al. 2003; Schwerdt et al. 2012; Namsolleck und Unger 2014; Indra et al. 2014). Zwei große klinische Studien konnten Aldosteron eine Bedeutung bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz zuschreiben. Eine Mineralokortikoid-Rezeptor (MR)-Blockade durch Eplerenon oder Spironolacton konnte ein Rückgang der Mortalität und Morbidität bei herzinsuffizienten und Postinfarktpatienten bedingen (Pitt et al. 1999, 2003).

Erst Mitte der 1980er Jahre wurde erstmals auch ein nicht-genomischer, also von Transkriptions-Vorgängen unabhängiger, Effekt von Aldosteron beschrieben (Moura und Worcel 1984). Im Gegensatz zu genomischen Effekten tritt dieser Effekt innerhalb weniger Sekunden bis Minuten auf und ist nicht immer durch klassische Aldosteronrezeptor-Antagonisten zu inhibieren (Haseroth et al. 1999; Good et al. 2002). Die fehlende Antagonisierbarkeit einiger nicht-genomischer Effekte brachte die Theorie eines völlig neuen und unbekanntem Rezeptors auf, welcher nicht-genomische Effekte MR-unabhängig vermittelt.

Inzwischen ist bekannt, dass nicht nur physiologische (Wang et al. 2005; Matsui et al. 2007), sondern auch pathophysiologische Veränderungen, z.B. des kardiovaskulären Systems (Mihailidou et al. 2004; Chai et al. 2005; Min et al. 2005), über nicht-genomische Signalwege ablaufen können. Durch diese Erkenntnis wurde die Suche nach Aldosteron-induzierten Effekten an Herzmuskelzellen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen sowie einem möglichen pathophysiologischen Einfluss auf die entsprechenden Gewebe immer häufiger Gegenstand der Forschung. Letztlich scheinen auch Interaktionen zwischen genomischen und nicht-genomischen Signalwegen zu existieren, deren Mechanismen noch weitgehend unverstanden sind (Le Moellic et al. 2004; Grossmann und Gekle 2009; Meinel et al. 2014).

1.2 Funktion und Regulation von Aldosteron

Aldosteron ist das wichtigste natürliche Mineralokortikoid. Täglich werden in der Zona glomerulosa der Niere 50-250 µg Aldosteron gebildet und in die Blutbahn ausgeschüttet (Hilal-Dandan et al. 2014). Die Aktivierung von Mineralokortikoid-Rezeptoren (MR) am distalen Nierentubulus führt zu einem gesteigerten Einbau von Natriumkanälen (ENaC) und der Na⁺/K⁺-ATPase. Dadurch wird die Natrium-Reabsorption über das Epithel gesteigert, was eine vermehrte Wasserrückresorption zur Folge hat (Bonvalet 1998). Neben dieser natriumretinierenden Wirkung kommt es zu einer vermehrten Ausscheidung von Kalium-Ionen (K⁺), Ammonium-Ionen (NH₄⁺), Magnesium-Ionen (Mg²⁺) und Protonen (H⁺), was insgesamt einen Anstieg des pH-Wertes und des Extrazellulärvolumens, sowie eine Abnahme der Kaliumionenkonzentration zur Folge hat (Hilal-Dandan et al. 2014).

Stimuliert wird die Aldosteronausschüttung durch ein vermindertes Blutvolumen, einen verringerten Na⁺/K⁺-Quotienten und durch das adrenocorticotrope Hormon (ACTH).

Ein wichtiger Regulationsmechanismus der Aldosteronsekretion ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), ein funktionell kaskadenartig zusammenwirkendes Enzym-Hormon-System mit zentraler Bedeutung für die Blutdruckregulation. Bei Natriummangel und verminderter Nierendurchblutung (z.B. bei erniedrigtem Blutdruck) kommt es zur Ausschüttung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat der Niere. Renin bewirkt eine enzymatische Abspaltung von Angiotensin I aus Angiotensinogen. Angiotensin I wird wiederum durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in Angiotensin II gespalten, welches zum einen die Bildung von Aldosteron in der Nebenniere steigert, zum anderen stark vasokonstriktorisch über AT₁-Rezeptoren wirkt. Zu guter Letzt führt es auch zur Sekretion von Vasopressin aus der Hypophyse, das ebenfalls vasokonstriktiv und zudem antidiuretisch wirkt. Das RAAS sorgt damit für eine Aufrechterhaltung des Blutdruckes, z.B. bei Hypovolämie, Natriummangel oder verminderter Nierendurchblutung (Muller und Luft 1998; Hilal-Dandan et al. 2014).

Neben der Regulation des Elektrolyt-Haushaltes und der damit einhergehenden Beeinflussung des Blutdruckes spielt Aldosteron auch bei weiteren physiologischen Prozessen eine Rolle, die bisher kaum erforscht wurden. Hierzu zählt z.B. die auf nicht-genomischen Wege ablaufende Regulation der Elektrolyt-Homöostase, des pH-Wertes und des Zellvolumens (Schneider et al. 1997; Wang et al. 2005; Matsui et al. 2007; Ren et al. 2014).

Interessanterweise bindet Cortisol mit vergleichbarer Affinität an den MR, wobei Cortisol in etwa 1000-fach höherer Konzentration im Plasma vorliegt (Pascual-Le Tallec und Lombès 2005). Die Selektivität des Rezeptors für Aldosteron kommt dadurch zustande,

dass die 11-Hydroxysteroiddehydrogenase, welche in den Zielzellen der Mineralokortikosteroide gebildet wird, Cortisol in die inaktive Form Cortison umwandelt. Darüber hinaus wird durch Interaktion von Rezeptoruntereinheiten miteinander sowie mit zahlreichen Co-Aktivatoren und -Repressoren die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors beeinflusst (Pascual-Le Tallec und Lombès 2005).

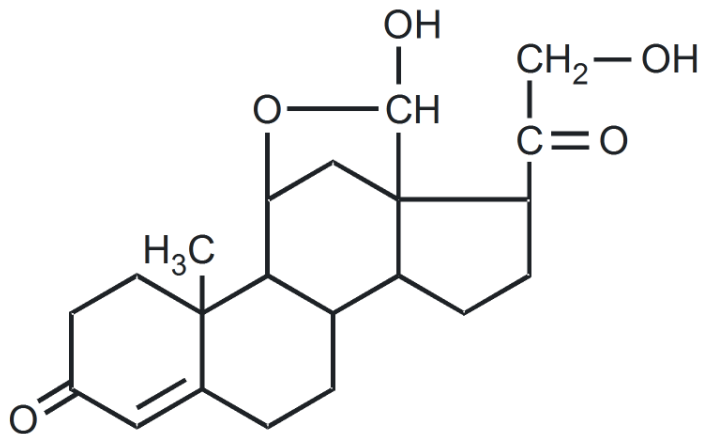


Abb. 1: Strukturformel von Aldosteron

Aldosteron ist ein Steroidhormon, das sich vom Cholesterin ableitet. Aufgrund der hohen Lipophilie und der geringen Hydrophilie kann es im Gegensatz zu anderen Hormonen direkt durch die Zellmembran diffundieren und an intrazelluläre Rezeptoren binden (Hilal-Dandan et al. 2014).

1.3 Pathophysiologische Rolle von Aldosteron

Der Normalwert von Aldosteron im Blutplasma liegt bei 75 – 300 pmol/l (Hilal-Dandan et al. 2014). Pathophysiologisch bedeutend ist eine über die Norm verminderte bzw. gesteigerte Aldosteronsekretion. Ein Hypoaldosteronismus kann bei Stoffwechselstörungen mit fehlerhafter Biosynthese des Aldosterons (z.B. Adrenogenitalem Syndrom) oder durch verschiedene Formen der Nebennierenrindeninsuffizienz (primär, sekundär u. tertiär) hervorgerufen werden. Beim primären Hyperaldosteronismus (Conn-Syndrom) findet die Übersekretion autonom in der Nebennierenrinde statt. Der häufigere sekundäre Hyperaldosteronismus ist Folge permanenter Überstimulation der Aldosteronproduktion durch extraadrenale Faktoren, insbesondere bei Aktivierung des RAAS. Dies ist der Fall bei z.B. Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, Nierenarterienstenose und Phäochromozytom. Auch die Anwendung einiger Medikamente (Diuretika, Laxanzien, Ovulationshemmer, β_2 -Sympathomimetika u.a.), eine Überproduktion von ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) und eine Hyperkaliämie führen zur Aktivierung des RAAS (Hilal-Dandan et al. 2014). Darüber

hinaus wurden ungünstige Effekte von Aldosteron nicht nur bei therapierefraktärem Bluthochdruck (Hall et al. 1996; Blasi et al. 2003), sondern auch bei chronischem Nierenversagen (Chrysostomou und Becker 2001; Lang und Schiffli 2013), insbesondere bei diabetischer Nephropathie (Sato et al. 2003; Han et al. 2006; Zain und Awan 2014) beschrieben. Im Folgenden soll jedoch insbesondere auf den pathophysiologischen Einfluss Aldosterons auf das kardiovaskuläre System eingegangen werden.

Eine übermäßige Aktivierung des RAAS führt nicht nur zu erhöhtem Blutdruck, sondern kann auch bestehende Grunderkrankungen, wie z.B. eine Herzinsuffizienz, negativ beeinflussen. So führt die gesteigerte Natrium- und Wasserretention (Aldosteron-Wirkung) zu einer Erhöhung der Vorlast des Herzens, die Vasokonstriktion (insbesondere Angiotensin-II-Wirkung) steigert die Nachlast des Herzens. Beides trägt zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion und Progredienz einer Herzinsuffizienz bei. Um diesen Circulus vitiosus zu durchbrechen, kann das kaskadenartige Zusammenspiel der Teilnehmer des RAAS auf mehreren Ebenen blockiert werden. Die letzte Stufe dieses Systems kann durch eine MR-Blockade durch Aldosteronantagonisten wie Spironolacton und Eplerenon blockiert werden. Die Wirkung dieser MR-Blockade konnte eindrucksvoll in zwei großen klinischen Studien (RALE und EPHEsus) gezeigt werden. Die zusätzliche Gabe von Spironolacton neben der Standardtherapie konnte eine Senkung der Mortalität und Morbidität bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz belegen (Pitt et al. 1999). Ein ähnlicher Effekt konnte durch die Anwendung von Eplerenon bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach Herzinfarkt gezeigt werden (Pitt et al. 2003). Der Erfolg dieser Studien bewirkte eine verstärkte Erforschung Aldosteron-induzierter Effekte am kardiovaskulären System. Es zeigte sich, dass Aldosteron an Inflammations- und Remodelingprozessen, die zu Hypertrophie und Fibrose führen, sowie an endothelialer Dysfunktion beteiligt ist (Brilla und Weber 1992; Rocha et al. 2002; Blasi et al. 2003; Nagata et al. 2006; Phelan et al. 2012; Indra et al. 2014). Die zugrundeliegenden Mechanismen der pathologischen Aldosteronwirkung sind noch weitgehend unklar. Es gibt aber Hinweise darauf, dass der Mineralokortikoidrezeptor in Makrophagen an der oben genannten Bindegewebsvermehrung pathogenetisch beteiligt ist (Rickard et al. 2009; Usher et al. 2010). Des Weiteren scheint der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) eine Rolle zu spielen, der proliferative und fibrotische Veränderungen am kardiovaskulären System fördert und dessen Expression durch Aldosteron stimuliert wird (Kagiyama et al. 2002; Francois et al. 2004; Grossmann et al. 2004, 2007). Ungeachtet vieler Unklarheiten scheinen bei klinisch relevanten Aldosteron-Wirkungen sowohl genomische als auch nicht-genomische Signalwege eine bedeutende Rolle zu spielen (Haseroth et al. 1999; Meinel et al. 2014).

1.4 Rezeptor und Signalweg

1.4.1 Primär genomischer Signal-Transduktionsweg

Aldosteron ist, wie auch andere Steroidhormone (Glukokortikoide und Sexualhormone), in der Lage durch die Zellmembran zu diffundieren und an intrazelluläre Rezeptoren zu binden. Diese klassischen zytosolischen Mineralokortikoid-Rezeptoren (MR) liegen in Abwesenheit des Liganden Aldosteron als Komplex mit Hitzeschockproteinen (Chaperone) im Zytoplasma vor. Die Bindung des MR führt zur Dissoziation der Hitzeschockproteine und Konformationsänderung des Rezeptors, worauf der Rezeptor-Liganden-Komplex in den Zellkern wandert und an bestimmte DNA-Abschnitte bindet. Der Rezeptor-Liganden-Komplex wirkt daher als Transkriptionsfaktor, der an eine bestimmte DNA-Sequenz in der Promotorregion von verschiedenen Zielgenen bindet und so deren Transkription reguliert (Farman 1999; Hilal-Dandan et al. 2014).

Der MR gehört innerhalb der Superfamilie der nukleären Rezeptoren zur Unterfamilie 3 (Östrogenrezeptor-artige), Gruppe C (Nuclear Receptor Nomenclature Committee 1999). Die Klonierung des entsprechenden Gens wurde erstmals 1987 beschrieben (Arriza et al. 1987). Es liegt beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 (Morrison et al. 1990) und besteht aus etwa 450 kb (Zennaro et al. 1995). Grossmann et al. haben insgesamt 6 verschiedene Rezeptor-Domänen (A-F) charakterisiert und gezeigt, dass ohne die Bindungsdomäne für DNA und die Coaktivator-Bindestelle (Domänen A-C) eine Vermittlung genomischer Effekte (im Gegensatz zu nicht-genomischen Effekten) nicht möglich ist (Grossmann et al. 2008).

Der MR wird in zahlreichen Geweben exprimiert, unter anderem in Niere, Dickdarm, Zentralnervensystem und Herzen, wo er jeweils unterschiedliche Funktionen ausübt. Gut untersucht ist die Regulierung der Genexpression des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), der epithelialen Natrium-Pumpe, der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und der Serin/Threonin-Protein-Kinase (SGK) (Arriza et al. 1987; Stockand 2002; Krug et al. 2003; Grossmann et al. 2004).

1.4.2 Primär nicht-genomischer Signal-Transduktionsweg

Nicht alle biologischen Effekte des MR werden durch eine DNA-Bindung und Regulation von Zielgenen vermittelt. Diese Aldosteron-induzierten Effekte, die nicht über Transkriptions- und Translationsvorgänge ablaufen und daher nicht durch Transkriptions-Inhibitoren blockierbar sind, werden als „nicht-genomisch“ bezeichnet (Moura und Worcel 1984).

Die erfolglose Inhibition schnell einsetzender Aldosteron-Effekte durch klassische MR-Antagonisten wie Eplerenon und Spironolacton (Good et al. 2002; Chai et al. 2005) lenkte den Verdacht auf einen völlig neuen MR-unabhängigen Aldosteron-Rezeptor (Haseroth et al. 1999; Grossmann et al. 2005; Ziera et al. 2009). Da jedoch auch einige akut einsetzende Aldosteron-Effekte erfolgreich antagonisiert werden konnten, geht man zum jetzigen Zeitpunkt von zwei verschiedenen primär nicht-genomischen Signalwegen aus (Grossmann et al. 2005; Meinel et al. 2014).

1. Es gibt einen nicht-genomischen Signalweg, welcher über den klassischen zytosolischen MR abläuft und daher durch klassische MR-Antagonisten blockierbar ist. Dieser Signalweg kann z.B. zur Aktivierung von ERK 1/2 („extracellular stimulus regulated kinase“) und JNK 1/2 („c-Jun N-terminal kinase“) führen und scheint den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und cSrc („proto-oncogene tyrosine-protein kinase“) in die Signalkaskade mit einzuschließen. Ob die Interaktion zu diesen Molekülen direkt oder über weitere Proteine vermittelt wird, ist nicht bekannt (Grossmann et al. 2005, 2010). Belegt ist jedoch, dass bestimmte Domänen (E/F) dieses Rezeptors essenziell für die Vermittlung nicht-genomischer Effekte sind. So kann z.B. ein verkürzter Rezeptor, dem die Domänen A-C fehlen, weiterhin nicht-genomische Effekte vermitteln. Andererseits ist eine DNA-Bindung und Kontrolle von Zielgenen durch diesen trunkierten Rezeptor (MR^{DEF}) nicht mehr möglich (Grossmann et al. 2008). Des Weiteren konnten Mihailidou et al. auch länger andauernde (bis zu 5 Stunden andauernde) nicht-genomische Effekt der Na⁺-K⁺-ATPase beschreiben, was eine Abgrenzung zu den ebenfalls länger andauernden genomischen Effekten erschwert. Die Vermittlung einer schnellen nicht-genomischen Signaltransduktion ist bereits bei anderen Steroidhormon-Rezeptoren, wie Östrogen- Progesteron- und Glukokortikoid-Rezeptoren, bekannt (Cato et al. 2002; Losel und Wehling 2003; Burge et al. 2013).

2. Es bestehen ebenfalls Hinweise auf die Existenz eines zweiten MR-unabhängigen Rezeptors. Die Lokalisation dieses Rezeptors, welcher nicht durch klassische MR-Antagonisten inhibierbar ist, wird an der Zellmembran vermutet (Haseroth et al. 1999; Ziera et al. 2009; Grossmann et al. 2010; Meinel et al. 2014). In Versuchen mit radioaktiv markiertem Aldosteron konnten an verschiedenen Zellen hoch selektive Bindungsstellen für Aldosteron an der Plasmamembran charakterisiert werden (Armanini et al. 1985; Wehling et al. 1992; Christ et al. 1994). Diese Bindungsstellen repräsentieren wahrscheinlich membrangebundene Rezeptoren (Christ et al. 1999; Meinel et al. 2014). Unklar ist jedoch, ob diese Bindungsstellen modifizierte klassische Mineralokortikoid-Rezeptoren darstellen, wie bereits für einige nicht-genomische Östrogen-Effekte beschrieben (Pappas et al. 1995; Ho und Liao 2002; Maggiolini und Picard 2010), oder

ob sie einen völlig neuen Aldosteron-Rezeptortyp darstellen (Wehling 1995). Grossmann et al. vermuten eine Kollokalisierung von MR-Fragmenten mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) an der Plasmamembran. Die Aktivierung des membrangebundenen Aldosteron-Rezeptors führt zu einer Transaktivierung des EGFR und leitet damit intrazelluläre Signalkaskaden (z.B. durch Phosphorylierung von ERK 1/2) ein (Grossmann et al. 2010). Obwohl die Existenz membrangebundener Rezeptoren bereits für andere Steroidhormone bekannt ist (Zhu et al. 2003; Orshal und Khalil 2004; Maggiolini und Picard 2010), blieb die Identifikation und Klonierung eines membrangebundenen Aldosteron-Rezeptors bisher ohne Erfolg.

Nicht-genomische Signalwege sind in Niere und Dickdarm (klassischen Aldosteron-Zielgeweben) an der Regulation von Elektrolyt-Homöostase, pH-Wert und Zellvolumen beteiligt (Schneider et al. 1997; Wang et al. 2005; Matsui et al. 2007). Zusätzlich sind aber auch pathophysiologische Veränderungen an nicht-klassischen Aldosteron-Zielgeweben, wie z.B. dem Herzen, bekannt (Mihailidou et al. 2004; Chai et al. 2005). Außerdem wird von einem Zusammenspiel von nicht-genomischen und genomischen Signalkaskaden ausgegangen, die in ihrer gemeinsamen Endstrecke auch zu Inflammations- und Remodelingvorgängen am Herzen führen (Brilla et al. 1993; Grossmann und Gekle 2009). Zu den Second-Messenger-Molekülen, die an diesen pathophysiologischen Veränderungen beteiligt sind, gehören u.a. PKC (Protein-Kinase-C), ERK 1/2 und die Generierung von ROS („reactive oxygen species“), was zu Schäden an Herzmuskelzellen und Induktion von Entzündungsprozessen führt (Mihailidou et al. 2004; Mano et al. 2004; Rude et al. 2005). Mittlerweile konnte eine große Fülle an Second-Messenger-Molekülen in verschiedenen Zelltypen gefunden werden, die in Aldosteron-induzierten nicht-genomischen Signalwegen involviert sind (siehe Abb. 2) (Benitah et al. 2001; Mihailidou et al. 2004; Mazak et al. 2004; Chai et al. 2005; Min et al. 2005; Alzamora et al. 2007; Grossmann et al. 2007; Matsui et al. 2007; Grossmann und Gekle 2009; Meinel et al. 2014). Die Interaktion dieser Moleküle mit dem MR sowie die Signalkaskaden, an denen sie beteiligt sind, um letztendlich biologische Effekte zu vermitteln, sind noch weitgehend unverstanden.

1.4.3 Interaktion zwischen genomischem und nicht-genomischem Signalweg

Es ist eine Vielzahl von Interaktionen zwischen genomischem und primär nicht-genomischem Signalweg beschrieben worden. Hierzu zählen sowohl synergistische Effekte beider Signalwege auf bestimmte Zielproteine als auch die Induktion genomischer Signalwege durch nicht-genomische Signalkaskaden. Beispielsweise führt

eine Aldosteron-induzierte und über die Proteinkinase-alpha (PKC α) vermittelte Phosphorylierung des MR zu dessen Aktivierung (Le Moellic et al. 2004). Auch die Steigerung der Genexpression von EGFR und ERK 1/2 kann über primär nicht-genomische Signalwege vermittelt werden (Sinphitukkul et al. 2011). So kann ein nicht-genomischer Signalweg durch Interaktion mit einem genomischen Signalweg zu lang andauernden Effekten führen. Diese Effekte wirken zwar primär nicht-genomisch, beeinflussen aber sekundär einen genomischen Effekt (sekundär genomischer Effekt).

Neben Interaktionen zwischen genomischen und nicht-genomischen Signalwegen liegen auch Interaktionen zu anderen pathophysiologisch relevanten Signalkaskaden vor. So konnte in glatten Muskelzellen ein synergistischer Effekt von Aldosteron und Angiotensin II sowohl auf die Expression verschiedener Gene als auch auf Phosphorylierung von Zielproteinen (ERK 1/2, JNK) gezeigt werden, wobei EGFR eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Mazak et al. 2004; Min et al. 2005). Der EGFR, dessen Rolle bei der Zellproliferation und Remodeling-Vorgängen bereits gut untersucht ist (Kagiyama et al. 2002; Francois et al. 2004), kann durch Aldosteron sowohl über eine Steigerung der EGFR-Expression (genomischer Effekt) als auch über eine Transaktivierung des EGFR durch Phosphorylierung (nicht-genomischer Effekt) beeinflusst werden (Grossmann et al. 2005, 2007). Die Abbildung 2 zeigt eine Übersicht von Signalkaskaden und Effekten, die durch Aldosteron induziert werden können.

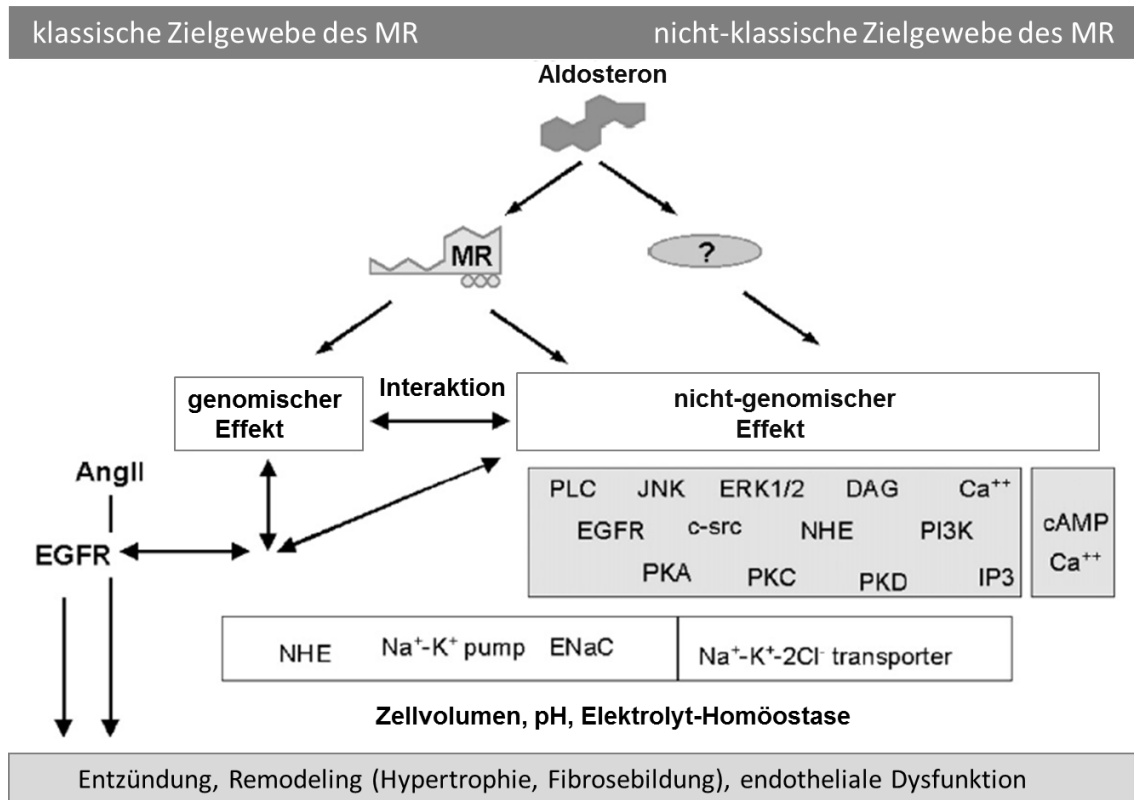


Abb. 2: Übersicht der verschiedenen Signalwege und Effekte von Aldosteron (nach: Grossmann und Gekle 2009)

MR (Mineralokortikoid-Rezeptor), PLC (Phospholipase C), JNK (c-Jun N-terminal kinase), ERK (extracellular-signal regulated kinase), DAG (1,2-Diacylglycerine), Ca²⁺, EGFR (epidermal growth factor receptor), c-src (proto-oncogene tyrosine-protein kinase), NHE (Na⁺/H⁺-Antiporter), PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), PKA (Proteinkinase A), PKC (Proteinkinase C), PKD (Proteinkinase D), IP3 (Inositoltrisphosphat), cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), Ang II (Angiotensin II), ENaC (epithelial Na-channel)

2 Zielsetzung der Arbeit

Aldosteron vermittelt seine Effekte sowohl auf genomischem als auch auf nicht-genomischem Wege. Diese Effekte beinhalten neben der Regulation der Elektrolyt-Homöostase auch pathologische Veränderungen des kardiovaskulären Systems. In der vorliegenden Arbeit sollte einerseits untersucht werden, ob und welche Aldosteron-induzierten Veränderungen des Herzens vorliegen, andererseits sollte unterschieden werden, ob diesen Veränderungen ein genomischer oder nicht-genomischer Wirkmechanismus zugrunde liegt. Hierzu wurde ein transgenes Tiermodell generiert, welches eine Differenzierung des dualen Wirkmechanismus von Aldosteron ermöglicht. Transgene Mäuse (TG), welche ein Konstrukt des humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR) überexprimieren, das ausschließlich nicht-genomische Effekte zu vermitteln in der Lage ist (hMR^{DEF}) (Grossmann et al. 2008), wurden neben Wildtyp-Mäusen (WT) mit unverändertem Aldosteron-Rezeptor untersucht. Außerdem sollte eine zweite transgene Mauslinie untersucht werden, welche den ungekürzten hMR („full-length-Konstrukt“) überexprimiert und damit sowohl genomische als auch nicht-genomische Effekte vermitteln kann. Die Etablierung dieser Mauslinie konnte jedoch aufgrund einer 100%igen Sterblichkeit transgener Nachkommen, die aus der Verpaarung mit dem „full-length-Zuchtweibchen“ hervorgingen, nicht verwirklicht werden.

Mit Hilfe von Organbad-Versuchen sollten sowohl die Kontraktionskraft sowie die Anspannungs- und Relaxationszeit linker Vorhöfe als auch die Schlagfrequenz rechter Vorhöfe untersucht und mögliche Unterschiede zwischen WT und TG herausgestellt werden. Des Weiteren sollten histologische Untersuchungen zur Kontrolle der erfolgreichen hMR^{DEF}-Expression sowie zur Demaskierung einer möglichen Fibrosebildung stattfinden. Veränderungen des Herzens auf elektrophysiologischer Ebene sollten mit Hilfe elektrokardiographischer Untersuchungen (EKG) analysiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Experimente wurden Mäuse des Inzuchtstammes FVB/N verwendet. Das Durchschnittsalter der Versuchstiere betrug am Versuchstag 71,2 Tage mit einem Gewicht von durchschnittlich 26,8 Gramm (siehe Abschnitt 4.3).

Die Mäuse wurden mit handelsüblichem Labortierfutter und Wasser ad libitum versorgt. Die Haltung und der Umgang mit den Mäusen geschahen nach dem bewilligten Protokoll (42502-5.14MLU) des Tierschutzkomitees der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

3.2 Herstellung der transgenen Mäuse

Für die Versuche sollten zwei verschiedene transgene Mauslinien (FVB/N Hintergrund) hergestellt werden, die eine Unterscheidung zwischen dem genomischen Effekt und dem primär nicht-genomischen Effekt von Aldosteron am Herzen möglich machen sollten. Hierzu wurden zwei DNA-Konstrukte hergestellt (siehe Abb. 3). Die „full-length Form“ besitzt die komplette cDNA des humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR), während das verkürzte Konstrukt (hMR^{DEF}) lediglich die Scharnierregion und die Ligand-Bindedomäne des hMR besitzt. Aufgrund des Fehlens der Coaktivator-Bindestelle und der Bindungsstelle für DNA ist bei dieser verkürzten Form keine DNA-Bindung mit nachfolgender Transkription und Translation möglich. Es sind daher nur primär nicht-genomische Effekte über diesen verkürzten Rezeptor (hMR^{DEF}) möglich. Beiden Konstrukten wurde der α Myosin heavy chain (α MHC) Promotor vorangestellt, welcher eine herzspezifische Expression dieser Sequenzen möglich macht (Ng et al. 1991). Ebenfalls enthalten beide DNA-Konstrukte eine Sequenz, die für das „enhanced green fluorescence protein“ (EGFP) kodiert und somit eine Detektion in vivo erlaubt (Tsien 1998; Grossmann et al. 2008). Dem DNA-Abschnitt wurde eine Simian Virus 40 (SV40)- Poly-A-Sequenz angehängt, durch die die Transkription terminiert wird (Gergs et al. 2010).

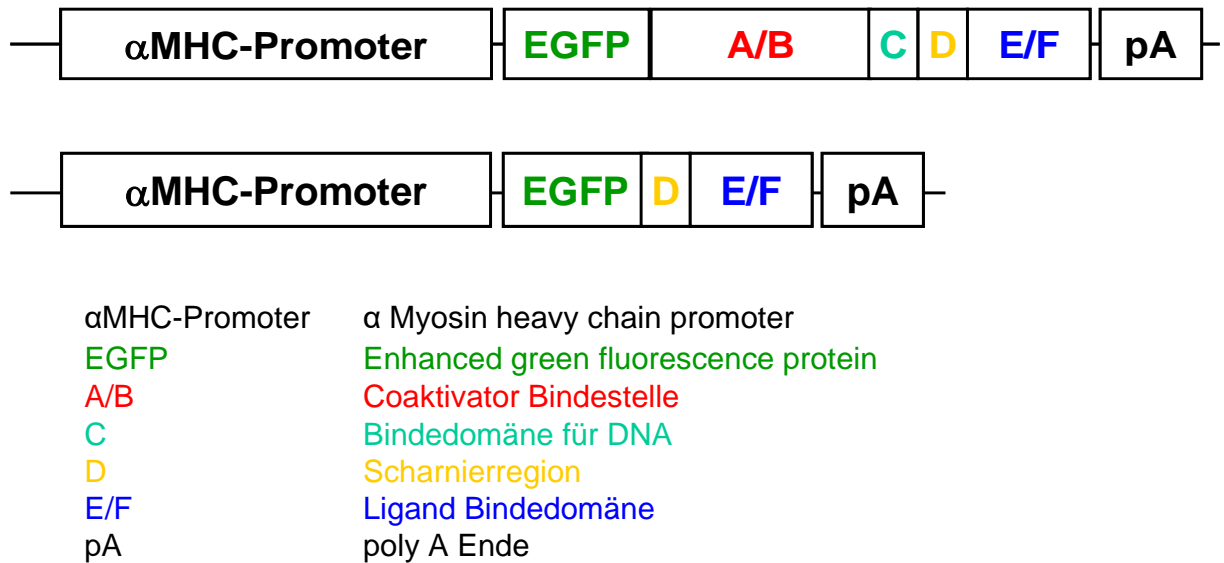


Abb. 3: Schematische Darstellung der Expressionskassette zur Herstellung transgener Mäuse

Dargestellt sind oben das „full-length DNA-Konstrukt“ (hMR) und unten die trunkierte Form (hMR^{DEF}). Beide Formen enthalten den αMHC Promotor, der zu einer herzspezifische Expression führt, das EGFP, um eine Detektion in vivo zu ermöglichen und ein poly-A-Schwanz, durch den die Transkription terminiert wird. Da dem verkürzten Rezeptor sowohl die Coaktivator-Bindungsstelle als auch die Bindungsstelle für DNA fehlt, sind über diesen Rezeptor keine primär genomischen Effekte möglich.

Die Expressionskassette wurde durch NruI-Verdau aus dem Vektor herausgeschnitten. Für die anschließende Pronukleus-Injektion wurden einzellige befruchtete Oozyten (Zygoten) verwendet und die entsprechende Expressionskassette in beide Pronuklei injiziert.

Die Herstellung dieser transgenen Mauslinien erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät, der Westfälischen Wilhelms Universität und der „Core facility“ für transgene Mäuse (TRAM) des interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) Münster.

Aufgrund einer 100%igen Letalität transgener Nachkommen, die aus der Verpaarung mit dem „full-length Zuchtweibchen“ hervorgingen und innerhalb der ersten 14 Lebenstage auftrat, konnte für den Beginn der geplanten Versuchsreihen keine „full-length-Mauslinie“ etabliert werden. Aus diesem Grunde wurden alle Experimente dieser Arbeit neben den Wildtyp-Mäusen ausschließlich mit transgenen Mäusen der verkürzten Linie (MR^{DEF}) durchgeführt.

3.3 Genotypisierung der Mäuse

3.3.1 DNA-Isolation

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde den vier Wochen alten Versuchstieren ein ca. 5 mm langes Schwanzstück mit dem Skalpell abgetrennt. Die Tiere bekamen danach eine Ohrmarkierung zur eindeutigen Zuordnung der Tiere. Die Schwanzstücke wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, welches mit 700 µl TE/SDS-Puffer gefüllt war. Zum enzymatischen Verdau wurden 30 µl Proteinase K zugegeben und die Mischung bei 55 °C über 12 Stunden in einem Thermomixer schüttelnd inkubiert.

Die Isolation der genomischen DNA aus dem Lysat wurde mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion vorgenommen (angelehnt an Sambrook und Russel 2000). Ziel dieser Methode ist die Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen: Durch mehrmalige Behandlung mit Phenol und Chloroform sowie Zentrifugation des Gemisches bilden sich jeweils eine obere wässrige und eine untere organische Phase. Die obere wässrige Phase enthielt die DNA, die untere organische Phase bzw. die Interphase enthält Proteine und andere Verunreinigungen.

Zu den enzymatisch verdauten Schwanzstücken wurden 700 µl puffergesättigtes Phenol zugegeben und durch Schütteln mit dem Lysat vermischt. Die Probe wurde drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, bis sich zwei Phasen gebildet hatten. Die obere wässrige Phase wurde von der unteren organischen Phase vorsichtig getrennt und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach der Mischung mit 700 µl Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) wurde erneut drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde erneut entnommen und mit 70 µl Natriumacetat (pH=6) und 770 µl reinstem Ethanol inkubiert. Dieser Schritt diente der Ausfällung und Reinigung der DNA von Phenolresten. Nach einer Zentrifugation von zehn Minuten bei 14000 rpm hatte sich am Boden des Gefäßes ein DNA-Sediment gebildet. Der Überstand wurde entfernt, das Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Sediment nun bei 30-35 °C im Heizblock getrocknet. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl TE-Puffer für 15 Minuten bei 65 °C inkubiert und dann bis zur Weiterverwendung bei 4 °C gelagert.

3.3.2 Konzentrationsmessung der DNA

Mit einem Photometer wurde die optische Dichte (OD) einer DNA-Lösung und damit ihr DNA-Gehalt bestimmt werden. Zunächst erfolgte eine Leerwertmessung ohne DNA als Kontrollwert. Der DNA-Gehalt der Probe wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm (E_{260}) bestimmt. Bei einer üblichen Schichtdicke der Messküvette von 1 cm und einem OD_{260} -Messwert von 1,0 enthält die Probe 50 µg/ml doppelsträngige DNA. Die Formel für den DNA-Gehalt lautet demnach $E_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = X \text{ µg/ml}$.

Mit der Berechnung des Quotienten aus der OD_{260} zur OD_{280} kann zusätzlich eine Bewertung der Qualität der Probe erfolgen. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 ist die DNA relativ frei von Proteinen und anderen Verunreinigungen.

3.3.3 PCR der DNA

Das gesuchte DNA-Fragment wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Zur Durchführung der PCR wurde die extrahierte DNA mit einem speziellen Reaktionsansatz in einem 0,2 ml PCR-Gefäß inkubiert. Jede Probe erhielt einen Standardpuffer mit 1,5 mM Magnesiumchlorid, 200 µM dNTP-Mix, 1 µM Forward-Primer, 1 µM Reverse-Primer und 2,5 U einer thermostabilen Taq-DNA-Polymerase (Details siehe Anhang). Die Proben wurden mit DEPC-Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 50 µl aufgefüllt. Das nachzuweisende DNA-Fragment hatte eine Größe von 700 Basenpaaren.

3.3.4 Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte wurden mit einer Agarosegelelektrophorese dargestellt werden, da kleine Moleküle im elektrischen Feld schneller wandern als große. Zur Beurteilung der Länge der DNA-Fragmente wurden zusätzlich ein Marker sowie eine Positiv- und Negativkontrolle aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einem 1%igen Agarosegel in einer TAE-Pufferlösung. Die Proben wurden mit 8 µl Ladepuffer (Zusammensetzung s. Anhang) versehen und in die Geltaschen gefüllt. Bei einer Spannung von 80 mV liefen die Proben ca. 45 Minuten. Unter UV-Licht konnten die mit Ethidiumbromid gefärbten Banden sichtbar gemacht werden.

3.4 Histologische Untersuchungen

Um mögliche histologische Veränderungen der Herzvorhöfe sichtbar zu machen, wurden Färbungen sowohl an Präparaten von Wildtyp-Mäusen als auch an transgenen Tieren vorgenommen. Zum einen wurden die Präparate auf das Vorliegen einer Fibrose untersucht. Hierzu wurde eine Trichromfärbung nach Masson durchgeführt. Zum anderen wurden immunhistologische Untersuchungen auf das Vorliegen des überexprimierten Aldosteronrezeptors (hMR^{DEF}) transgener Mäuse durchgeführt. Das DNA-Konstrukt dieser Mäuse enthält neben dem Rezeptor eine Sequenz, die für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) kodiert (siehe Abschnitt 2.2). Dieses Protein ermöglicht durch seine Fluoreszenzeigenschaften eine in vivo Detektion des überexprimierten Rezeptors. Aufgrund der hohen Autofluoreszenz der Gewebeproben wurde jedoch ein indirekter Nachweis mittels Anti-EGFP Antikörpern vorgenommen. Die Färbungen und histologischen Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Igor B. Buchwalow (Institut für Hämatopathologie, Fangdieckstrasse 75a, 22547 Hamburg) durchgeführt.

3.5 Kontraktionsversuche

3.5.1 Vorbereitung des Organbads

Zu Beginn jedes Versuches wurde eine frische Tyrodelösung aus vorbereiteten Stammlösungen hergestellt. Sie hatten den Zweck, ein physiologisches Milieu für die isolierten Vorhöfe zu schaffen. Die Tyrode setzte sich zusammen aus 40 ml Stammlösung I, 38 ml Stammlösung II und 20 ml Stammlösung III (Zusammensetzung siehe Anhang). Mit Reinstwasser wurde die Lösung auf 1 Liter aufgefüllt. Nach einer 30-minütigen Begasung mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) wurden 0,8 ml Kalziumchlorid-Lösung (33,2 g CaCl₂/100 ml H₂O), 1 g Glucose, 49,3 mg Ascorbinsäure und 19 mg Na₂EDTA hinzugefügt. Die Endkonzentration von CaCl₂ betrug 1,8 mM (Endkonzentrationen der Tyrode siehe Anhang). Während des gesamten Versuches wurde die Lösung auf eine Temperatur von 37 °C angewärmt und kontinuierlich mit Carbogen begast. Es wurden nur Lösungen verwendet, die einen physiologischen pH von 7,4 aufwiesen.

3.5.2 Vorbereitung und Kalibrierung der Messanlage

Die Messanlage für isometrische Kontraktionen bestand aus doppelwandigen Organbädern mit einem Volumen von je 10 ml (siehe Abb. 4). Das Innengefäß wurde mit Tyrode gefüllt und bot Raum für je ein Muskelpräparat. Am unteren Badrand befand sich der Anschluss für die Carbogenzufuhr. Im äußeren Teil des doppelwandigen Gefäßes befand sich ein Zu- und Abfluss für einen Wasserkreislauf, mit dem die Tyrode indirekt beheizt wurde.

Über zwei starre Metalldrähte konnten die Präparate befestigt und in das Organbad eingehängt werden. Der obere Metalldraht war mit einem isometrischen Kraftmesser verbunden, der direkt über einen Brückenverstärker die Kontraktionskraft an einen Schreiber weiterleitete. Zu Versuchsbeginn wurde eine Vorschubgeschwindigkeit von 5 mm pro Minute eingestellt. Während der Versuche wurde die Geschwindigkeit des Schreibers zeitweise auf 100 mm pro Sekunde erhöht, um eine bessere Beurteilung der Einzelkontraktionen zu ermöglichen.

Zur elektrischen Reizung der linken Vorhöfe befanden sich zwei Reizelektroden im Organbad. Diese waren neben den Vorhöfen platziert. Linke Vorhöfe wurden mit einer Frequenz von 1 Hz und Rechteckimpulsen von 5 ms Dauer elektrisch stimuliert. Die Spannung lag ca. 10-20 % über der Reizschwelle. Es wurden Messungen der Kraft sowie der Anspannungs- und Erschlaffungszeit vorgenommen. Bei intaktem Sinusknoten und vorhandenem Reizleitungssystem kontrahierten die rechten Vorhöfe spontan und mussten nicht elektrisch gereizt werden.

Zur Kalibrierung des Schreibers wurde zunächst ein Nullpunkt festgelegt. Dann wurde ein 500 mg schweres Gewicht an den Metallhaken gehängt und der Ausschlag des Schreibers für verschiedene Empfindlichkeitsstufen dokumentiert. Die Zugkraft der Muskelpräparate konnte so nachfolgend mit der Kalibrierung auf das Gewicht korreliert werden.

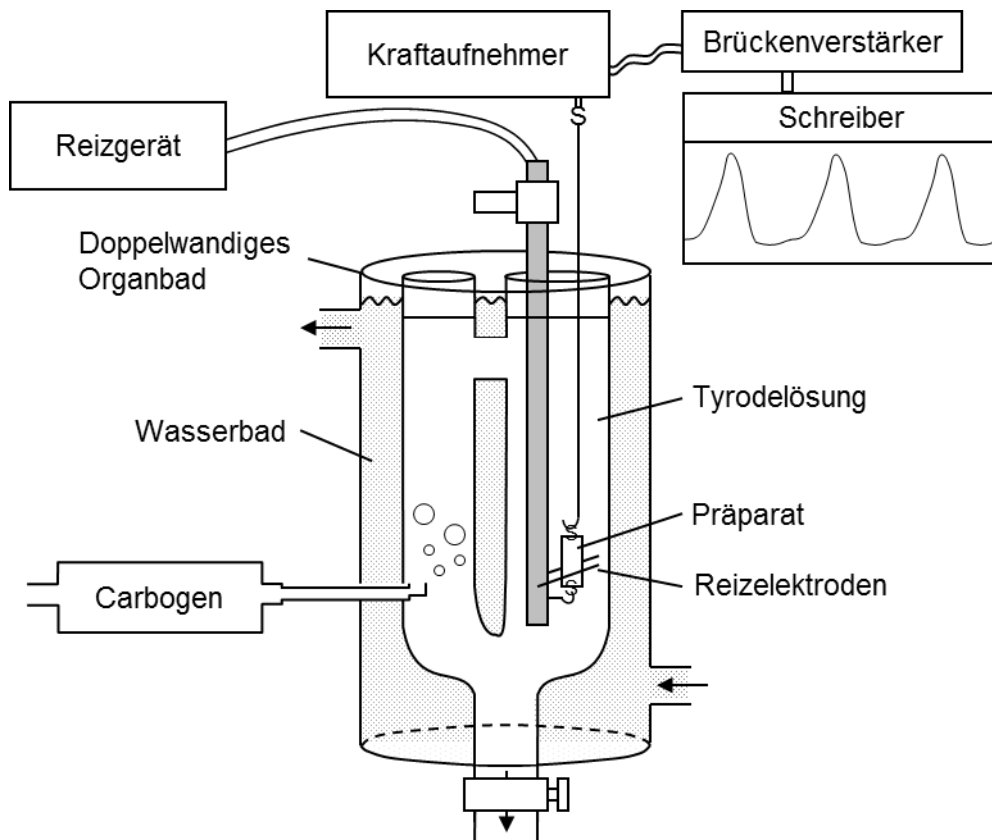


Abb. 4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für isometrische Kontraktionsmessungen (Abb.: J. Frenker 2012)

Abgebildet sind das wassergespülte doppelwandige Organbad mit dem zwischen den Reizelektroden aufgehängtem Muskelpräparat, das Reizgerät, der Kraftaufnehmer, der Brückenverstärker und der Schreiber. Der Schreiber zeichnet die Muskelkontraktionen als Mechanogramm auf. Die Tyrodellösung im Organbad wird mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast und durch das Wasserbad kontinuierlich umspült und auf 37°C temperiert.

3.5.3 Präparation der Mäuse

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse gewogen, um die benötigte Menge Narkosemittel zu berechnen und um später das relative Herzgewicht zu bestimmen. Die Tiere mussten für die Experimente nicht nüchtern bleiben und hatten bis zur Präparation Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Zur Verhinderung einer Thrombusbildung im Herzen bei der Präparation wurden den Mäusen vor der Narkotisierung 500 IE Heparin intraperitoneal gespritzt.

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit 50-75 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital, welches intraperitoneal gespritzt wurde. Ziel der Anästhesie war es, eine tiefe Bewusstlosigkeit zu erreichen, um eine schmerzbedingte Katecholaminausschüttung bei der nachfolgenden Präparation zu vermeiden. Jedoch sollte die Narkose nicht

unmittelbar zum Atemstillstand führen, um die Oxygenierung des Herzmuskels nicht zu gefährden.

Bei Eintritt der Bewusstlosigkeit und sobald keine Reaktion auf Schmerzreize mehr erkennbar war, wurden die Mäuse mit dem Rücken in eine Präparierschale gelegt, an allen vier Extremitäten fixiert und es wurde mit der Präparation begonnen werden. Besonderen Wert wurde auf eine zügige Präparation gelegt, um die Ischämiezeit der Herzmuskulatur zu minimieren.

Von ventral her wurde mit einer Schere der Thorax eröffnet. Im Bereich des Abdomens wurde ein vertikaler Schnitt durch Fell und Haut bis zum Sternum geführt. Zwei weitere Schnitte wurden entlang der Rippenbögen gesetzt. Mit diesen Schnitten wurden Pleura und Peritoneum eröffnet. Mit einer am Sternum fixierten Klemme konnten nun die gesamten Rippen nach kranial umgeschlagen werden, was eine freie Sicht auf das Herz ermöglichte. Das Herz konnte nach Durchtrennung der Vena cava und des Aortenbogens aus dem Thorax entnommen werden und wurde sofort in ein Gefäß mit raumtemperierter Tyrode überführt. Durch vorsichtige Kompression wurden Blutreste aus dem noch schlagenden Herzen entfernt.

3.5.4 Präparation der Herzen

Die wie unter 3.5.3. entnommenen Mäuseherzen wurden sofort nach der Präparation in eine mit Tyrode-Lösung gefüllte und mit Carbogen begaste Präparierschale gebracht. Zunächst wurde das Herz mit Nadeln fixiert und der linke Vorhof exzidiert. Am oberen und unteren Pol des Präparates wurden Metallhaken in das Muskelgewebe gestochen, um eine Aufhängung in die Versuchsanordnung zu ermöglichen. Die eingehängten Präparate wurden sofort in das mit Tyrode gefüllte Organbad eingetaucht. Wie in 3.5.2 beschrieben, wurden die linken Vorhöfe elektrisch gereizt und es wurde ein Mechanogramm der Kontraktionskraft aufgezeichnet.

Innerhalb von einer halben Stunde wurde die Tyrode dreimal gewechselt und es stellte sich ein Gleichgewicht der Kraft ein. In dieser Zeit mussten die Präparate häufig noch nachgespannt werden.

Bei der Präparation der rechten Vorhöfe wurden zunächst Reste der Lungen und der großen Blutgefäße entfernt. Dann wurde der rechte Vorhof vorsichtig vom Ventrikel getrennt. Dabei war eine äußerst sorgfältige Präparation notwendig, um den Sinusknoten nicht zu verletzen, der sich im Bereich der Mündung der Vena cava superior befindet. Auch in die rechten Vorhöfe wurden zwei Haken gestochen, und die Präparate wurden in die Versuchsanordnung eingehängt. Die Präparate wurden bis zur optimalen Kraftentwicklung vorgespannt. Durch den intakten Sinusknoten und das vorhandene

Reizleitungssystem kontrahierten die rechten Vorhöfe spontan und mussten nicht elektrisch gereizt werden. An diesen Vorhöfen konnte die Schlagfrequenz gemessen werden.

Zeigten die Vorhöfe schon zu Beginn Arrhythmien, die auch nach dreimaligem Wechsel der Tyrode im Organbad und bei optimaler Vorspannung nicht sistierten, konnte man von einer Schädigung des Muskels bei der Präparation ausgehen. Diese Vorhöfe wurden nicht weiterverwendet.

3.5.5 Versuchsdurchführung und Messprotokolle

Mit der Durchführung der Messprotokolle konnte begonnen werden, nachdem die Präparate in das Organbad eingehängt und unter optimale Vorspannung gebracht worden waren. Außerdem war eine etwa 30-minütige Äquilibration der Vorhöfe mit dreimaligem Spülen der Präparate mit frischer Tyrode-Lösung notwendig. Das Organbad wurde während des gesamten Versuchs auf 37°C temperiert. Die Protokolle wurden gleichermaßen an rechten und linken Vorhöfen transgener Tiere sowie Wildtyp-Vorhöfen durchgeführt.

Da Aldosteron mit seinem Steroidgerüst eine hydrophobe Substanz darstellt, also in Wasser unlöslich ist, wurde zu dessen Lösung 100%iges Ethanol verwendet. Ethanol ist aufgrund seines organischen Restes sehr gut mit lipophilen Substanzen wie Aldosteron mischbar. Um zu unterscheiden, ob ein Effekt auf die Vorhöfe durch Aldosteron oder dessen Lösungsmittel Ethanol allein zustande kommt, war es notwendig, isoliert die Wirkung von Ethanol auf die Vorhöfe zu untersuchen.

In Versuchsprotokoll Nr.1 (Tab. 1) wurde zunächst mit einer kumulativen Ethanol-KWK (Lösungsmittelkontrolle) begonnen. Sie startete mit einem Volumenanteil von 0,0001 % Ethanol und wurde in 5 Schritten bis zu einem Volumenanteil von 0,01 % fortgeführt. Diese aufsteigenden Ethanolkonzentrationen im Organbad entsprechen den Konzentrationen des Lösungsmittels bei der Erstellung der Aldosteron-Kraft-Wirkungskurve (siehe Abschnitt 4.4.2). Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Pipettierschritten betrug jeweils 5 Minuten. Der Ethanol-KWK folgte das dreimalige Ausspülen der Präparate mit frischer Tyrode-Lösung. Nachdem sich eine konstante Kraft der Präparate eingestellt hatte, wurde eine kumulative Aldosteron-KWK mit Erhöhung der Konzentrationen von 10^{-8} M Aldosteron in Dreierschritten bis 10^{-6} M erstellt. Schließlich wurde nach drei weiteren Auswaschschritten mit Tyrode-Lösung eine Konzentrationswirkungskurve mit Isoprenalin angefertigt. Diese KWK begann mit der niedrigsten Konzentration von 10^{-9} M Isoprenalin und wurde in 3er-Schritten bis zu einer Maximalkonzentration von 10^{-6} M fortgesetzt. Das Zeitintervall der einzelnen

Pipettierschritte richtete sich hierbei nach dem Zeitpunkt, zu dem keine weitere Kraftzunahme zu beobachten war. Bei jedem Pipettierschritt wurde, kurz bevor die nächst höhere Konzentration hinzugegeben wurde, die Schreibergeschwindigkeit von 5 mm pro Minute auf 100 mm pro Sekunde erhöht, um die Einzelkontraktionen besser darzustellen. Die Versuchsdurchführung des Protokolls Nr.1 ist in der folgenden Tabelle veranschaulicht.

Tab. 1: Pipettierprotokoll 1

Reihenfolge und Konzentrationen der für die Experimente an linken und rechten Vorhöfen eingesetzten Substanzen. Zu Beginn wurde eine Ethanol-Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) durchgeführt. Nachdem die Präparate mit Tyrode-Lösung gespült wurden, erfolgte eine Aldosteron-KWK und nach erneutem Spülen abschließend eine Isoprenalin-KWK.

Substanz	Konzentration im Organbad
Ethanol	0,0001 Vol.-%, 0,0003 Vol.-%, 0,001 Vol.-%, 0,003 Vol.-%, 0,01 Vol.-%
Auswaschen	
Aldosteron	10^{-8} M, 3×10^{-8} M, 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M
Auswaschen	
Isoprenalin	10^{-9} M, 3×10^{-8} M, 10^{-8} M, 3×10^{-8} M, 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M

Der Versuchsablauf des Messprotokolls Nr. 2 (Tab. 2) erfolgte in ähnlicher Weise wie der des Protokolls Nr.1. Die Substanzen und deren Konzentrationen wurden bei dieser Versuchsdurchführung nicht verändert. Im Unterschied zu Protokoll 1 wurde hier mit der Durchführung einer Aldosteron-KWK begonnen. Nach einem Auswaschschritt wurde als zweites eine Lösungsmittelkontrolle mit Ethanol angefertigt. Der anschließende Waschschritt mit der Erstellung einer Isoprenalin-KWK entspricht dem Versuchsablauf aus Protokoll Nr. 1.

Tab. 2: Pipettierprotokoll 2

Substanz	Konzentration im Organbad
Aldosteron	10^{-8} M, 3×10^{-8} M, 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M
Auswaschen	
Ethanol	0,0001 Vol.-%, 0,0003 Vol.-%, 0,001 Vol.-%, 0,003 Vol.-%, 0,01 Vol.-%
Auswaschen	
Isoprenalin	10^{-9} M, 3×10^{-8} M, 10^{-8} M, 3×10^{-8} M, 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M

Es kann davon ausgegangen werden, dass sich ein frisch eingespannter Vorhof hinsichtlich seiner Kraft anders verhält als ein Präparat, welches sich schon einige Zeit im Organbad befunden hat. Durch die Ausführung dieser beiden Protokolle war es möglich, sowohl die Wirkung von Aldosteron als auch die Wirkung von dessen Lösungsmittel (Ethanol) unter den gleichen zeitlichen Bedingungen zu untersuchen. Würde z.B. nur der Ablauf des ersten Protokolls verwendet, wäre eine Unterscheidung zwischen einer Kraftabnahme unter steigender Aldosteronkonzentration (negative Inotropie) und einem Abschaffungseffekt des Muskels mit zunehmender Zeit nicht eindeutig zu differenzieren. Beide Protokolle wurden daher mit einer ähnlichen Anzahl von Tieren durchgeführt. Die ausgewerteten Ethanol- und Aldosteron-KWKs (siehe Abb. 11 u. 12) enthalten somit ähnlich viele Messdaten sowohl für die zeitlich frühe als auch für die zeitlich späte Auswertung der Kraft. Das Gleiche gilt für die Auswertung der Anspannungs- und Relaxationszeiten sowie für die Erstellung der Frequenz-Kurven rechter Vorhöfe unter Aldosteron und Ethanol.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Protokollen Nr. 1 und Nr. 2 wurde der Effekt des selektiven Aldosteron-Antagonisten Kaliumcanrenoat untersucht. In jeweils zwei Versuchsreihen beider Protokolle wurde Kaliumcanrenoat ohne einen vorherigen Waschschrift direkt nach der Aldosteron-KWK hinzugegeben, so dass sich eine Konzentration von 10^{-5} M Kaliumcanrenoat im Organbad ergab. Die Schreibertätigkeit wurde daraufhin für etwa 15 Minuten aufgezeichnet. Nach dreimaligem Auswaschen des Organbades mit Tyrode-Lösung wurde wie nach obigen Protokollen weiter fortgefahren.

3.6 Elektrokardiographische Untersuchungen (EKG)

Vor der elektrokardiographischen Untersuchung wurden die Mäuse mit Midazolam (18 mg/kg KG) und Ketamin (160 mg/kg KG) narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde durch Testung des Zwischenzehenreflexes ermittelt. Nach Beendigung des EKG's wurde die Narkose durch den kompetitiven Benzodiazepin-Antagonisten Flumazenil (5mg/kg KG) aufgehoben.

Zur Messung elektrischer Potenzialänderungen zwischen den Extremitäten wurde an den narkotisierten Mäusen die bipolare Ableitung nach Einthoven (I.) durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere zunächst in Rückenlage gebracht und die Gliedmaßen mit Elektrodengel benetzt, um anschließend Klemmelektroden aus Stahldraht darüber zu ziehen. Die Versuchsanordnung entsprach einem kommerziellen EKG-System (BioAmp, AD-Instruments, Spechbach, Deutschland). Aufgezeichnet wurde das EKG durch die Software „Chart 5“ (PowerLab, ADInstruments, Spechbach, Deutschland), mit der anschließend auch die relevanten Parameter (Frequenz, P-Welle, PQ-, QRS-, RR, sowie QTc-Intervall) analysiert wurden. Neben den oben genannten Parametern wurde besonders auf mögliche Arrhythmien und Überleitungsstörungen geachtet.

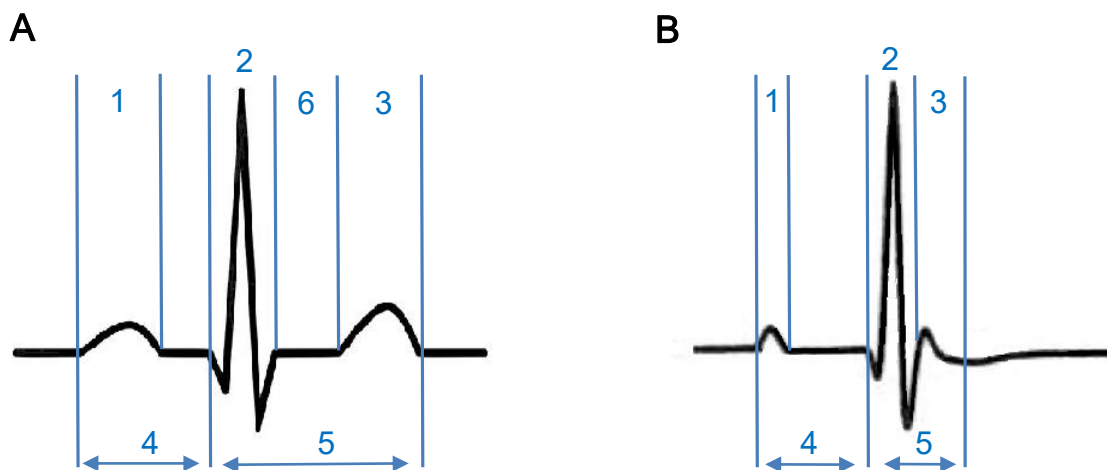


Abb. 5: Darstellung der elektrischen Erregungsleitung im Herzen beim Menschen (A) und der Maus (B) (modifizierte Abb. nach: Müller 2004)

Abbildung A zeigt ein schematisches EKG eines Menschen. Physiologisch besitzt der Mensch eine Herzfrequenz von ca. 70 Schlägen/min. In Abbildung B ist ein typisches Maus-EKG dargestellt, physiologisch ist die Herzfrequenz der Maus bis zu zehnfach höher als beim Menschen (ca. 400 - 700 Schläge/min).

1 = Vorhof Erregung (P-Welle), 2 = Erregung der Herzkammern (QRS-Intervall), 3 = Erregungsrückbildung der Kammer (T-Welle), 4 = atrioventrikulären Leitungszeit (PQ-Intervall), 5 = intraventrikuläre Erregungsdauer (QT-Intervall), 6 = isoelektrisches ST-Intervall.

3.7 Statistische Auswertung

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten sind als arithmetische Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test oder im Falle eines Vergleiches von mehr als zwei Gruppen mittels Varianzanalyse ANOVA mit nachfolgender Fehlertestung nach Bonferroni ermittelt. Als signifikant galt ein p-Wert kleiner als 0,05. Die Datenerfassung (Vorhöfe) erfolgte mit der Software „IOX“ (emka TECHNOLOGIES, Paris, Frankreich). Die Auswertung der Ergebnisse wurde mit GraphPad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Prism Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Anzahl der Einzelversuche wird im Folgenden als „n“ bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Genotypisierung der Versuchsmäuse

Die Identifikation der transgenen Mäuse erfolgte durch eine Auftrennung von PCR-Produkten mittels Gelelektrophorese. Zuvor wurde die genomische DNA aus Schwanzstücken der Mäuse extrahiert und das Transgen mittels PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 3.3.1 und 3.3.3).

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA wurde im Vorfeld photometrisch die optische Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm gemessen und deren Quotient bestimmt. Dieser Quotient lag bei allen Proben zwischen 1,8 und 2,0, was für einen hohen Reinheitsgrad der DNA spricht.

Durch dieses Vorgehen konnte gezeigt werden, dass nur die transgenen Mäuse die verkürzte Form des Mineralokortikoidrezeptors (hMR^{DEF}) im Genom enthalten (Abb. 6).

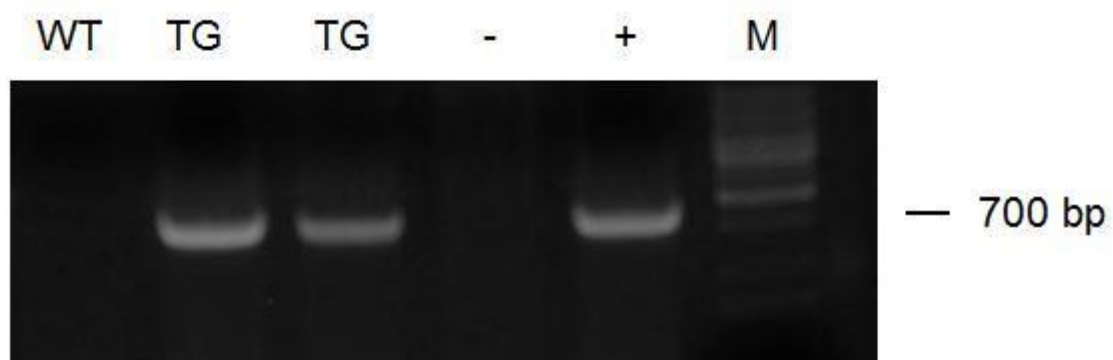


Abb. 6: Genotypisierung durch PCR

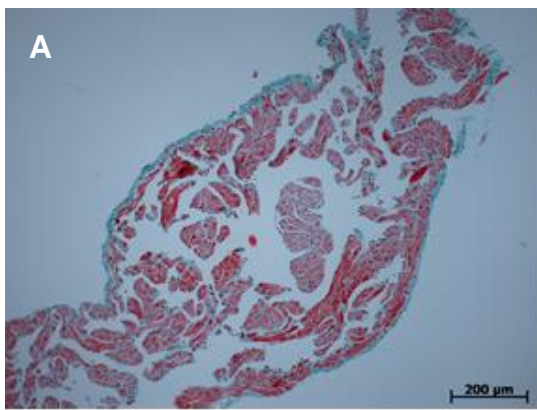
Die Abbildung zeigt die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte. Nur bei den transgenen Tieren (TG) ist es zu einer Amplifikation der 700 Basenpaar (bp) großen DNA-Sequenz gekommen. Zur Beurteilung der Fragmentgröße ist eine 100 bp DNA-Leiter (M) als Standard mitgelaufen. WT, Wildtyp; TG, transgenes Tier; -, Negativkontrolle; +, Positivkontrolle

4.2 Histologische Untersuchungen der Herzvorhöfe

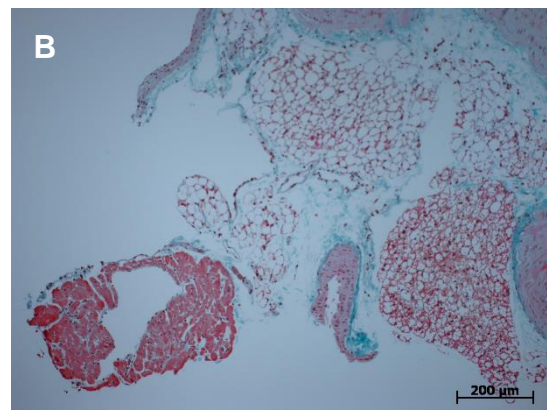
Um mögliche pathologische Veränderungen der Vorhöfe beurteilen zu können, wurden histologische Untersuchungen sowohl an Wildtyp als auch an transgenen Mäusen vorgenommen.

Das Vorliegen einer Fibrose wurde mit Hilfe der Trichromfärbung nach Masson untersucht. Hier zeigte sich weder bei Wildtyp- noch bei transgenen Mäusen eine Fibrosebildung. Die Ergebnisse der Fibrosefärbung sind in Abbildung 7 dargestellt.

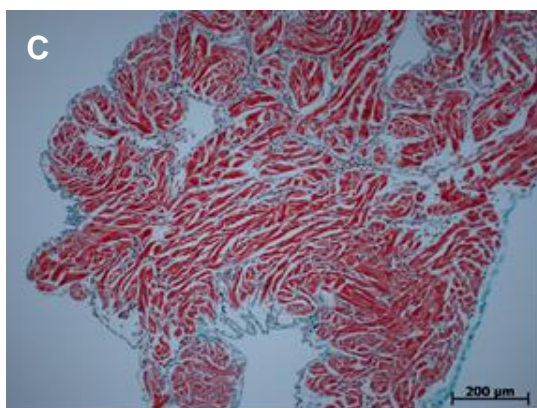
WT rechter Vorhof



hMR^{DEF} rechter Vorhof



WT linker Vorhof



hMR^{DEF} linker Vorhof

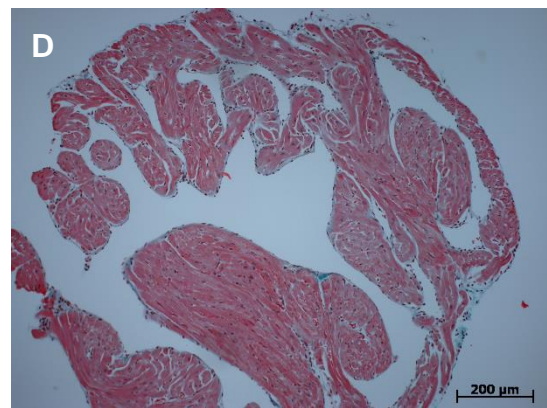


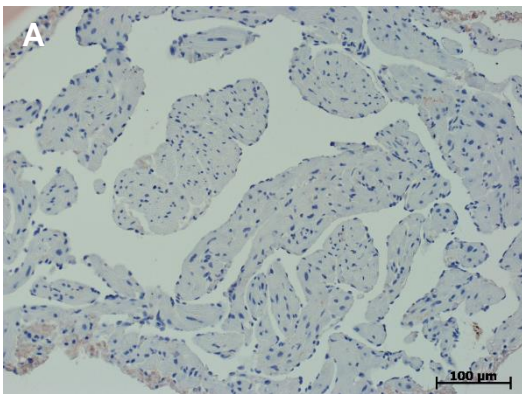
Abb. 7: Fotografien der Fibrosefärbung nach Masson

Mittels Trichromfärbung nach Masson bearbeitete rechte und linke Vorhöfe von WT (A, C) und TG (B, D). Es konnte kein Unterschied zwischen WT und TG bezüglich des Fibrosegrades gezeigt werden

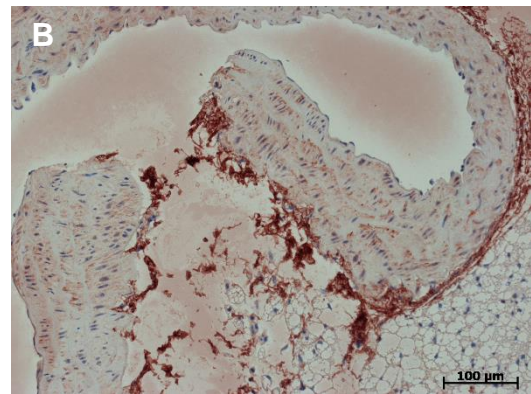
WT, Wildtyp-Präparat; TG, transgenes Präparat

Des Weiteren wurden immunhistologische Untersuchungen für den Nachweis des überexprimierten Aldosteronrezeptors (hMR^{DEF}) transgener Mäuse durchgeführt. Das DNA-Konstrukt dieser Mäuse enthält neben dem Rezeptor eine Sequenz, die für das „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) kodiert (siehe Abschnitt 3.2). Dieses Protein ermöglicht durch seine Fluoreszenzeigenschaften eine in vivo-Detektion des überexprimierten Rezeptors. Aufgrund der hohen Autofluoreszenz der Gewebeproben wurde jedoch ein indirekter Nachweis mittels Anti-EGFP Antikörpern vorgenommen. Die Untersuchungen konnten eine deutliche Expression des EGFP in Vorhöfen transgener Tiere, jedoch nicht bei ihren Wildtyp-Geschwistertieren zeigen (Abb. 8).

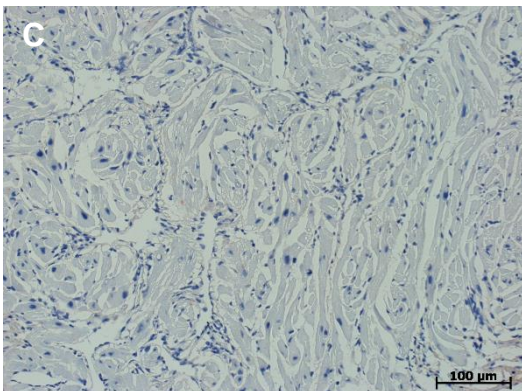
WT rechter Vorhof



hMR^{DEF} rechter Vorhof



WT linker Vorhof



hMR^{DEF} linker Vorhof

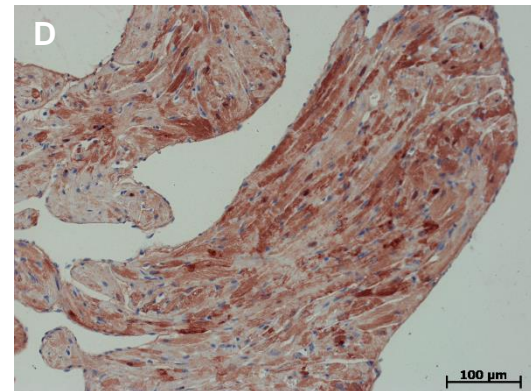


Abb. 8: Immunhistologie zum Nachweis des EGFP („enhanced green fluorescent protein“)

Das EGFP konnte mittels Anti-EGFP-Antikörper bei Präparaten rechter und linker Vorhöfe transgener Mäuse nachgewiesen werden (B, D). Dagegen ist es bei rechten und linken Vorhöfen von Wildtyp-Mäusen (A, C) zu keiner EGFP-Expression gekommen.

4.3 Gravimetrie

Unmittelbar vor jedem Versuch wurden die Tiere gewogen und ihr Gesamtkörpergewicht bestimmt. Nach der Durchführung der Kontraktions-Experimente erfolgte die Bestimmung der Gewichte von rechten und linken Vorhöfen und Ventrikeln. Insgesamt wurden so gravimetrische Daten von 46 Tieren bestimmt. Hierunter fielen 24 Wildtyp-Mäuse mit einem Anteil von 17 männlichen und 7 weiblichen Tieren. Die Anzahl der transgenen Tiere betrug 22, hierunter befanden sich 15 männliche und 7 weibliche Mäuse.

Bei der Bestimmung des Gesamtkörpergewichtes (Abb. 9A) zeigte sich ein Unterschied ($p < 0,05$) zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren. Während das Durchschnittskörpergewicht männlicher Tiere $28,96 \pm 2,06$ g betrug, wogen die weiblichen Mäuse im Durchschnitt $24,72 \pm 1,76$ g. Ein geschlechtsunabhängiger Unterschied im Gesamtkörpergewicht von Wildtyp-Mäusen ($28,23 \pm 2,67$ g) und transgenen Mäusen ($27,07 \pm 2,82$ g) war nicht festzustellen.

Für die Bestimmung des relativen Herzgewichtes (Abb. 9B) wurde das Verhältnis des Herzgewichtes zum Gesamtkörpergewicht bestimmt. Das Herzgewicht setzt sich hierbei aus der Summe beider Vorhöfe und Ventrikel zusammen. Wie die Abbildung 9B zeigt, war hier weder zwischen WT und TG noch zwischen weiblichen und männlichen Tieren ein Unterschied zu erkennen. Zwar wogen weibliche Mäuse im Durchschnitt signifikant weniger als männliche (Abb. 9A), jedoch war ihr Herzgewicht ebenfalls signifikant niedriger als das männlicher Tiere. Das relative Herzgewicht weiblicher Herzen wurde mit $4,72 \pm 0,63$ mg/g, das männlicher mit $4,96 \pm 0,61$ mg/g gemessen.

Die linken Vorhöfe der Weibchen wogen mit $3,58 \pm 0,87$ mg weniger als die der Männchen, die ein Gewicht von $5,36 \pm 1,19$ mg aufwiesen (Abb. 9C). Ein Gewichtsunterschied zwischen transgenen ($4,88 \pm 1,28$ mg) und nicht transgenen linken Vorhöfen ($4,76 \pm 1,47$ mg) konnte nicht festgestellt werden. Auch die Gewichte der Ventrikel wiesen einen geschlechtsabhängigen Unterschied auf. Das Gewicht männlicher Ventrikel wurde mit $123,80 \pm 14,89$ mg, das weiblicher mit $97,01 \pm 7,14$ mg gemessen. Ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen WT ($117,70 \pm 17,24$ mg) und TG ($113,40 \pm 18,88$ mg) konnte bei den Ventrikeln nicht festgestellt werden. Die Gewichte rechter Vorhöfe zeigten weder zwischen WT und TG noch zwischen Männchen und Weibchen einen Unterschied. Letzteres ist wahrscheinlich der bei der Präparation im Vergleich zum linken Vorhof weniger eindeutigen Resektionsgrenzen geschuldet.

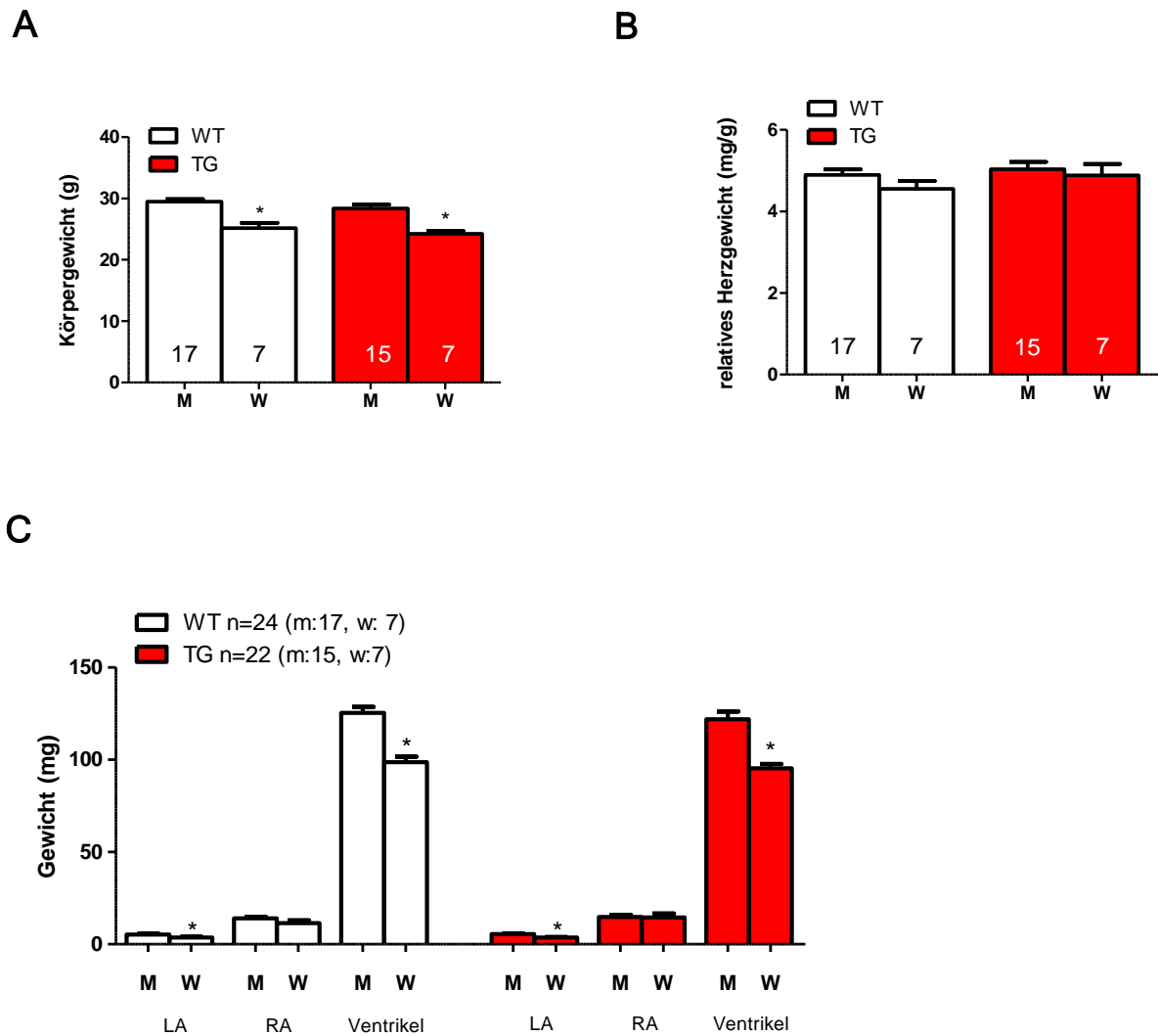


Abb. 9: Gravimetrie

A Gesamtkörpergewicht von WT und TG bzw. Männchen (M) und Weibchen (W). Es zeigt sich ein geringes Körpergewicht der Weibchen im Vergleich zu männlichen Tieren. Ordinate: Körpergewicht in Gramm (g)

B Relatives Herzgewicht von WT und TG bzw. Männchen (M) und Weibchen (W). Es zeigt sich weder zwischen Männchen u. Weibchen noch zwischen WT u. TG ein Gewichtsunterschied. Ordinate: Relatives Herzgewicht in Milligramm pro Gramm (mg/g)

C Gewichte von linken Vorhöfen, rechten Vorhöfen und Ventrikeln von WT und TG bzw. männlichen und weiblichen Mäusen. LA, linker Vorhof; RA, rechter Vorhof. Ordinate: Gewicht in Milligramm (mg)

„n“ (und die Zahlen in den Säulen) geben die Anzahl der Tiere an. M, Männchen; W, Weibchen; weiße Säulen, Wildtyp-Mäuse (WT); rote Säulen, transgene Mäuse (TG); * $p < 0,05$ vs. M

4.4 Untersuchungen an linken Vorhöfen

4.4.1 Kontraktionsexperimente mit Ethanol (Lösungsmittelkontrolle)

Da die zu untersuchende Substanz Aldosteron bei allen Versuchen in Ethanol gelöst vorlag, musste zunächst getestet werden, ob ein Effekt von Ethanol auf die Herzvorhöfe bestand. Zu diesem Zweck wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) für Ethanol erstellt. Der bei dieser KWK minimale Volumenanteil lag bei 0,0001 % Ethanol und wurde in 5-minütigen Abständen in 5 Schritten bis auf 0,01 Vol.-% erhöht. Dies entspricht den Zeitabständen und den Ethanol-Konzentrationen des Lösungsmittels, welches bei der Erstellung der Aldosteron-KWK verwendet wurde (umgerechnet ca. 22 μ M bis 2,2 mM Ethanol). Noch höhere Mengen wie 100 μ l Ethanol haben einen negativ inotropen Effekt.

Die Abbildung 10 zeigt einige repräsentative Mechanogramme einer Wildtyp-Maus für die Untersuchung der Kraftwirkung von Ethanol (Abb. 10A), Aldosteron (Abb. 10B) und Isoprenalin (Abb. 10C). Zur besseren Erfassung des Kraftverlaufes sind die Zeitintervalle, in denen die Schreibergeschwindigkeit von 5 mm pro Minute auf 100 mm pro Sekunde erhöht wurde (Darstellung der Einzelkontraktionen), nicht mit abgebildet. Nach Ethanol- und Aldosteronzugabe wurde jeweils etwa 5 min bis zum nächsten Pipettierschritt gewartet. Die Isoprenalinzugabe erfolgte nach Einstellung einer konstanten Kraftentwicklung.

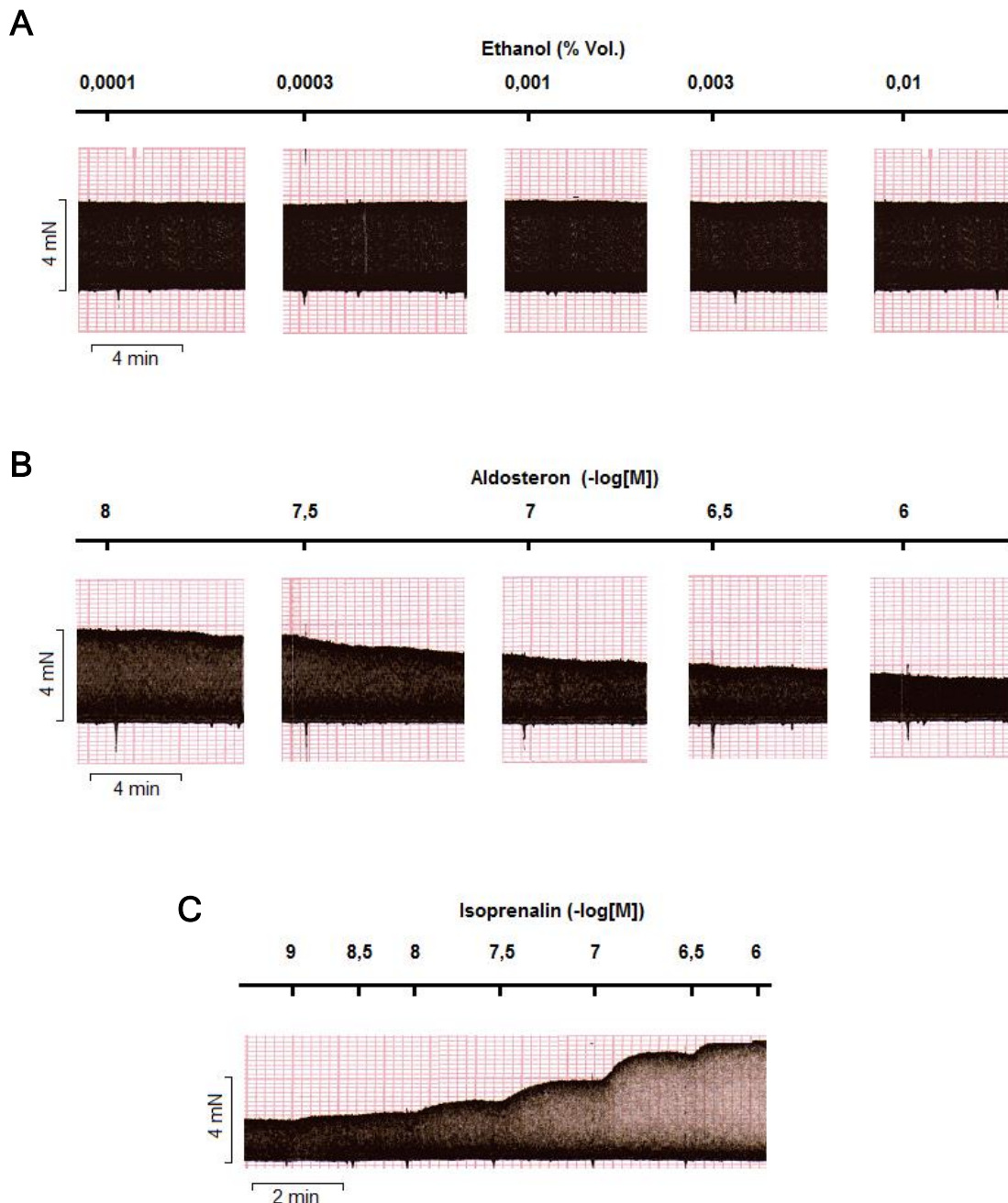


Abb. 10: Originalmechanogramme elektrisch gereizter linker Vorhöfe

Mechanogramme einer Wildtyp-Maus für die Untersuchung der Kraftwirkung von Ethanol (A), Aldosteron (B) und Isoprenalin (C). Ethanol zeigt keinen Effekt auf die Kontraktionskraft. Aldosteron hat eine negativ inotrope Wirkung, Isoprenalin einen positiv inotropen Einfluss auf die linken Vorhöfe.

Ordinate: Kontraktionskraft, Abszisse: Zeit in Minuten. Die Erhöhung der Ethanol- und Aldosteronkonzentration erfolgte in 5-minütigen Abständen. Isoprenalin wurde nach Einstellung eines Kraftplateaus zugegeben.

Für die Ethanol-Konzentrations-Wirkungskurve (Lösungsmittelkontrolle) wurden insgesamt 16 Tiere untersucht, darunter waren 11 transgene und 5 Wildtyp-Mäuse. Die Ausgangskraft lag bei $5,8 \pm 1,1$ mN (WT) und $5,4 \pm 0,3$ mN (TG). Zwar kam es im Verlauf zu einem geringen Absinken der Kontraktionskraft, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ($p > 0,05$).

Abbildung 11 zeigt die Lösungsmittelkontrolle, also den Einfluss von Ethanol auf die Kraft linker Vorhöfe.

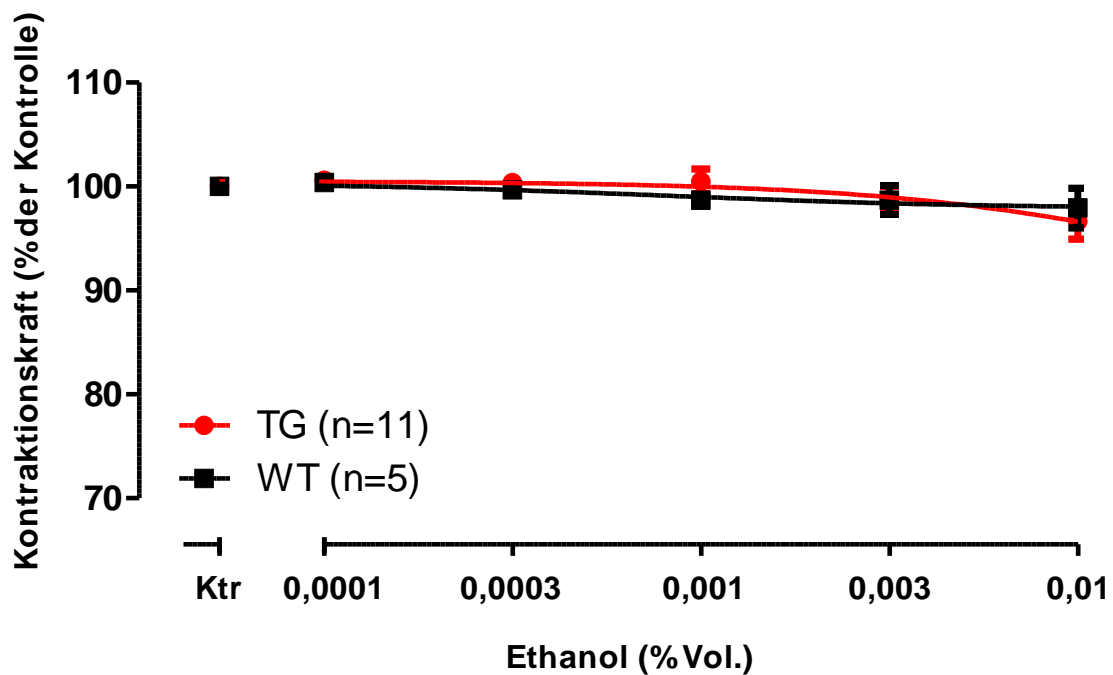


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Ethanol (Lösungsmittelkontrolle)

Mit zunehmender Ethanol-Konzentration zeigt sich keine signifikante Veränderung der Kontraktionskraft linker Herzvorhöfe. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Versuche an. Ktr steht für den Kontrollwert, also vor Zugabe von Ethanol.

Abszisse: Ethanol-Konzentration in % Vol.; Ordinate: Kontraktionskraft in Prozent (%) der Kontrolle

4.4.2 Kontraktionsexperimente mit Aldosteron

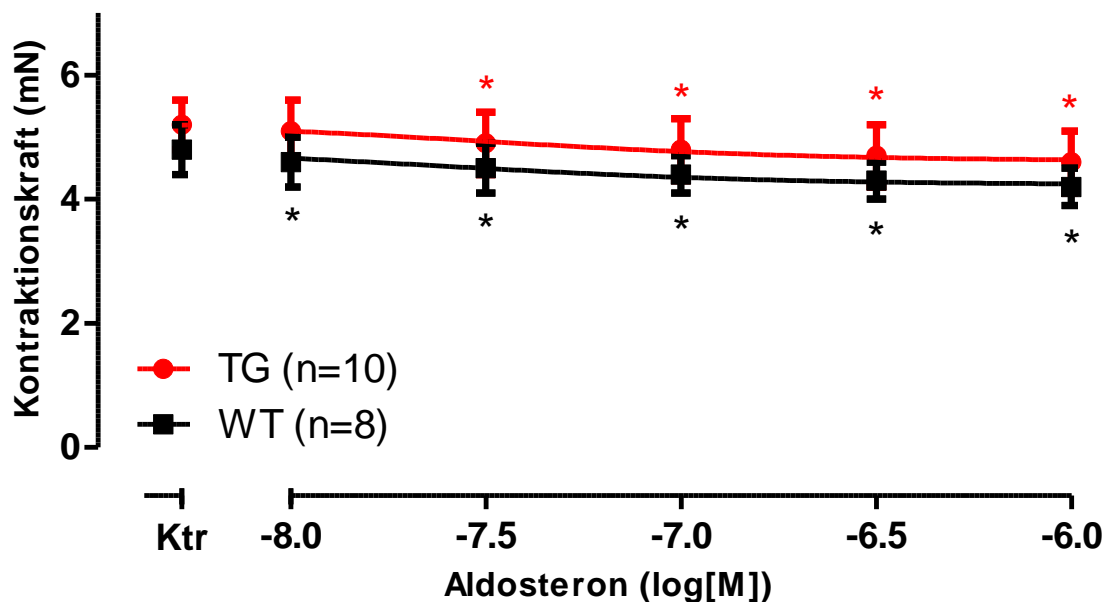
Es wurden insgesamt an 18 linken Vorhöfen Versuche zur Kontraktilität unter steigender Aldosteron-Konzentration unternommen. Hierunter befanden sich 8 Vorhöfe von Wildtyp-Mäusen und 10 von transgenen Tieren. Nach Präparation der Vorhöfe (siehe Abschnitt 3.5.4) wurden diese in das Organbad überführt und die entsprechenden Messprotokolle (siehe Abschnitt 3.5.5) ausgeführt.

Es zeigte sich kein Unterschied ($p > 0,05$) in der Ausgangskraft linker Vorhöfe zwischen Wildtyp-Mäusen ($4,8 \pm 0,4$ mN) und transgenen Tieren ($5,2 \pm 0,4$ mN). Mit zunehmender Aldosteron-Konzentration kam es sowohl bei WT als auch TG zu einer Abnahme der Kontraktionskraft (negative Inotropie). Bei WT zeigte sich dieser Kraftverlust ($p < 0,05$) bereits bei einer Aldosteron-Konzentration von 10^{-8} M mit $5,1 \pm 0,5$ mN, bevor es zu einer weiteren Abschwächung der Kraft auf Werte von $4,2 \pm 0,3$ mN bei einer maximalen

Aldosteron-Konzentration von 10^{-6} M kam. Bei den transgenen Geschwistertieren zeigte 3×10^{-8} M Aldosteron eine negativ inotrope Wirkung ($p < 0,05$). Im weiteren Verlauf nahm die Kontraktionskraft bis auf Werte von $4,6 \pm 0,5$ mN bei einer Aldosteron-Konzentration von 10^{-6} M ab. Ein Unterschied der Kraftabnahme zwischen WT und TG konnte jedoch nicht gefunden werden (Abb. 12A).

Bei der Betrachtung der Kontraktionskraft in Prozent (%) im Vergleich zur Ausgangskraft (100 %) zeigte sich sowohl bei WT (97,10 % im Vergleich zur Kontrolle) als auch bei TG (97,50 % im Vergleich zur Kontrolle) bereits bei der niedrigsten Aldosteron-Konzentration (10^{-8} M) eine Abnahme der Kraft ($p < 0,05$). Die größte Kraftabnahme war bei einer Aldosteron-Konzentration von 10^{-6} M zu verzeichnen. Vorhöfe transgener Mäuse wiesen hier noch $86,42 \pm 2,9$ % der Ausgangskraft auf, Wildtyp-Mäuse noch $88,19 \pm 2,7$ %. Zwischen WT und TG gab es keinen Unterschied. Zusammenfassend lässt sich also ein Kraftverlust bei WT und TG von mehr als 10 % unter der Höchstkonzentration von 10^{-6} M Aldosteron konstatieren (Abb. 12B).

A



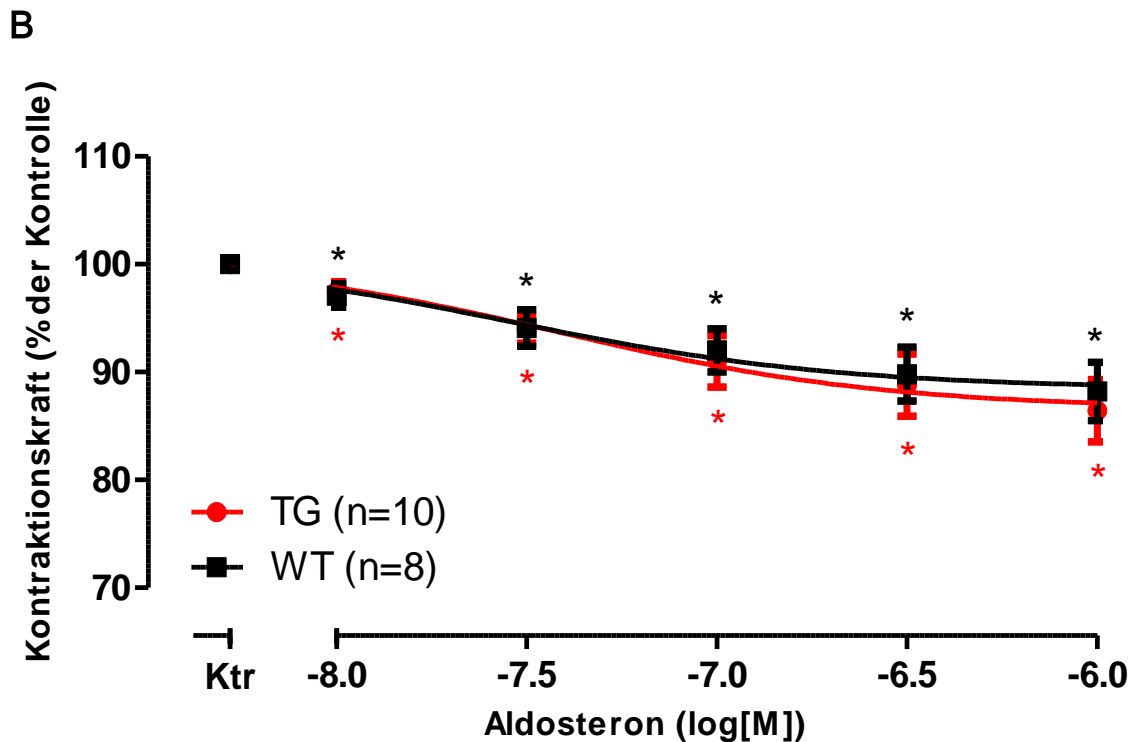


Abb. 12: Einfluss von Aldosteron auf die Kontraktionskraft linker Vorhöfe

A Kontraktionskraft elektrisch gereizter linker Vorhöfe in mN bei zunehmender Aldosteron-Konzentration. Es zeigen sich insgesamt eine Kraftabnahme von $4,8 \pm 0,4$ mN auf $4,2 \pm 0,3$ mN bei WT und eine Abnahme der Kontraktionskraft von $5,2 \pm 0,4$ mN auf $4,6 \pm 0,5$ mN bei TG. Der Vergleich der Kraftabnahme zwischen WT und TG zeigt keinen Unterschied. Abszisse: Aldosteron-Konzentration in log (M); Ordinate: Kontraktionskraft in mN

B Kontraktionskraft elektrisch gereizter linker Vorhöfe in Prozent (%) der Ausgangskraft. Vorhöfe transgener Mäuse weisen insgesamt eine Kraftabnahme von $13,58 \pm 2,9$ % im Vergleich zur Kontrolle auf, Präparate von Wildtyp-Mäusen einen Verlust von $11,81 \pm 2,7$ % im Vergleich zum Ausgangswert.

Abszisse: Aldosteron-Konzentration in log (M); Ordinate: Kontraktionskraft in % der Kontrolle

Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Versuche an. Ktr steht für den Kontrollwert, also vor Zugabe von Aldosteron. * $p < 0,05$ vs. Ktr

4.4.3 Kontraktionsexperimente mit Isoprenalin

Isoprenalin ist eine synthetisch hergestellte Substanz, die als nicht-selektives β -Sympathomimetikum (Wirkung sowohl auf β -1- als auch auf β -2-Rezeptoren) stimulierend auf die β -Rezeptoren des Herzens wirkt und dadurch eine positiv chronotrope, inotrope, bathmotrope und dromotrope Wirkung entfaltet (Hilal-Dandan et al. 2014).

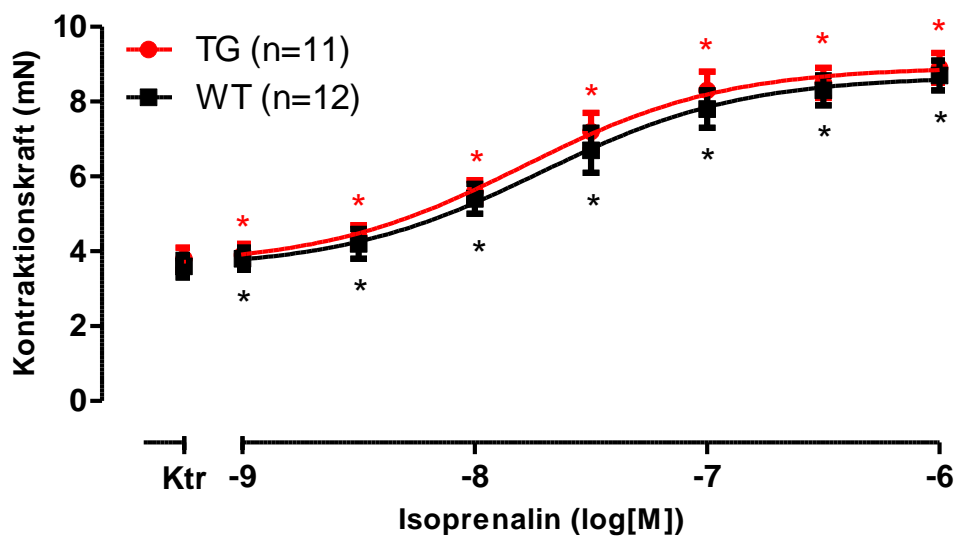
Kontraktionsversuche linker Vorhöfe mit Isoprenalin wurden, wie schon in Abschnitt 3.5.5 beschrieben, am Ende jedes Messprotokolls durchgeführt. Insgesamt wurden an 23 linken Vorhöfen Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Darunter befanden sich 11 Präparate transgener Tiere und 12 von Wildtyp-Mäusen. Die Ausgangskraft der Präparate betrug $3,6$

$\pm 0,3$ mN bei Wildtyp-Mäusen und $3,8 \pm 0,3$ mN bei transgenen Mäusen, was statistisch keinen Unterschied darstellt. Bei der geringsten Konzentration von 1 nM ($= 10^{-9}$ M) Isoprenalin kam es bereits zu einem Anstieg der Kraft bei Wildtyp-Präparaten ($3,8 \pm 0,3$ mN) und transgenen Vorhöfen ($3,9 \pm 0,3$ mN). Die stärkste Kraftentwicklung zeigte sich bei der höchsten Konzentration von 1 μ M ($= 10^{-6}$ M) Isoprenalin bei WT mit $8,7 \pm 0,4$ mN und TG mit $8,9 \pm 0,4$ mN. Die Maximalkraft transgener Vorhöfe unterschied sich nicht von den Wildtyp-Vorhöfen (Abb. 13).

Bei der Betrachtung der Kraftänderung in Prozent (%) zum Ausgangswert (100%ige Kraft) konnte bei der geringsten Isoprenalin-Konzentration von 1 nM bei WT eine Zunahme der Kraft von $3,1 \pm 1,3$ % und bei TG eine Zunahme von $5,8 \pm 1,9$ % festgestellt werden. Die höchste Kraftzunahme wurde bei WT ($244,9 \pm 16$ % im Vergleich zur Ausgangskraft) und TG ($258,9 \pm 23$ % im Vergleich zur Ausgangskraft) bei einer Konzentration von 1 μ M Isoprenalin gefunden (Abb. 13B).

Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) ist die Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet werden kann. Der negative dekadische Logarithmus der EC_{50} (pEC_{50}) wurde bei WT bei $-7,78 \pm 0,4$ log (M) und TG bei $-7,85 \pm 0,2$ log (M) Isoprenalin gemessen. Es konnte kein Unterschied des pEC_{50} zwischen WT und TG festgestellt werden ($p > 0,05$).

A



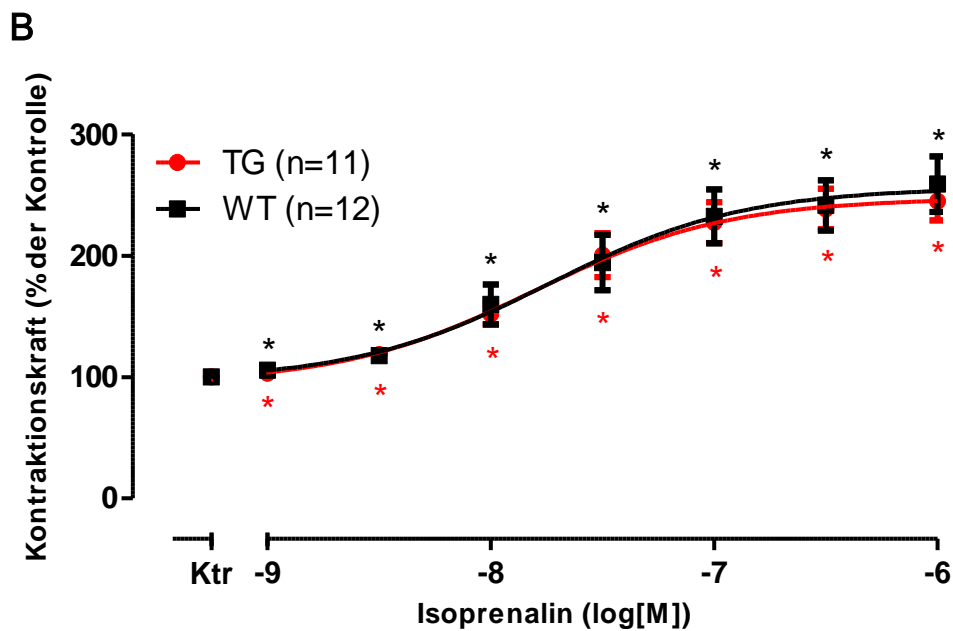


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin

A Kontraktionskraft elektrisch gereizter linker Vorhöfe in mN bei zunehmender Isoprenalin-Konzentration. Es zeigt sich eine Kraftzunahme von $3,6 \pm 0,3$ mN auf $8,7 \pm 0,4$ mN bei WT und eine Zunahme der Kontraktionskraft von $3,8 \pm 0,3$ mN auf $8,9 \pm 0,4$ mN bei TG. Der Vergleich der Kraftzunahme zwischen WT und TG zeigt keinen Unterschied.

Abszisse: Isoprenalin-Konzentration in log (M); Ordinate: Kontraktionskraft in mN

B Kontraktionskraft elektrisch gereizter linker Vorhöfe in Prozent (%) der Ausgangskraft. Vorhöfe transgener Mäuse weisen insgesamt eine Kraftzunahme von $244,9 \pm 16$ % im Vergleich zur Kontrolle auf, Präparate von Wildtyp-Mäusen eine Zunahme von $258,9 \pm 22,8$ % im Vergleich zum Ausgangswert.

Abszisse: Isoprenalin-Konzentration in log (M); Ordinate: Kontraktionskraft in % der Kontrolle

Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Versuche an. Ktr steht für den Kontrollwert vor Substanzzugabe. * $p < 0,05$ vs. Ktr

4.4.4 Anspannungs- und Relaxationszeiten

Zusätzlich zur entwickelten Kraft wurde mit Hilfe der Versuchsapparatur (siehe Abb. 4) und der dazugehörigen Software die Anspannungs- und Relaxationszeit (Erschlaffungszeit) linker Vorhöfe gemessen.

Die Anspannungszeit (TTP) wird in dieser Arbeit aufgefasst als die Zeit vom Kraftbeginn (10 % über der Basislinie) bis zum Kraftmaximum. Die Relaxationszeit (RT) bezeichnet in der vorliegenden Arbeit den Zeitraum zwischen maximaler Kraftentwicklung und 90 % relaxierter Muskulatur (Abb. 14). Die mechanische Relaxation des Herzmuskels wird auch als Lusitropie bezeichnet (Mann 2014).

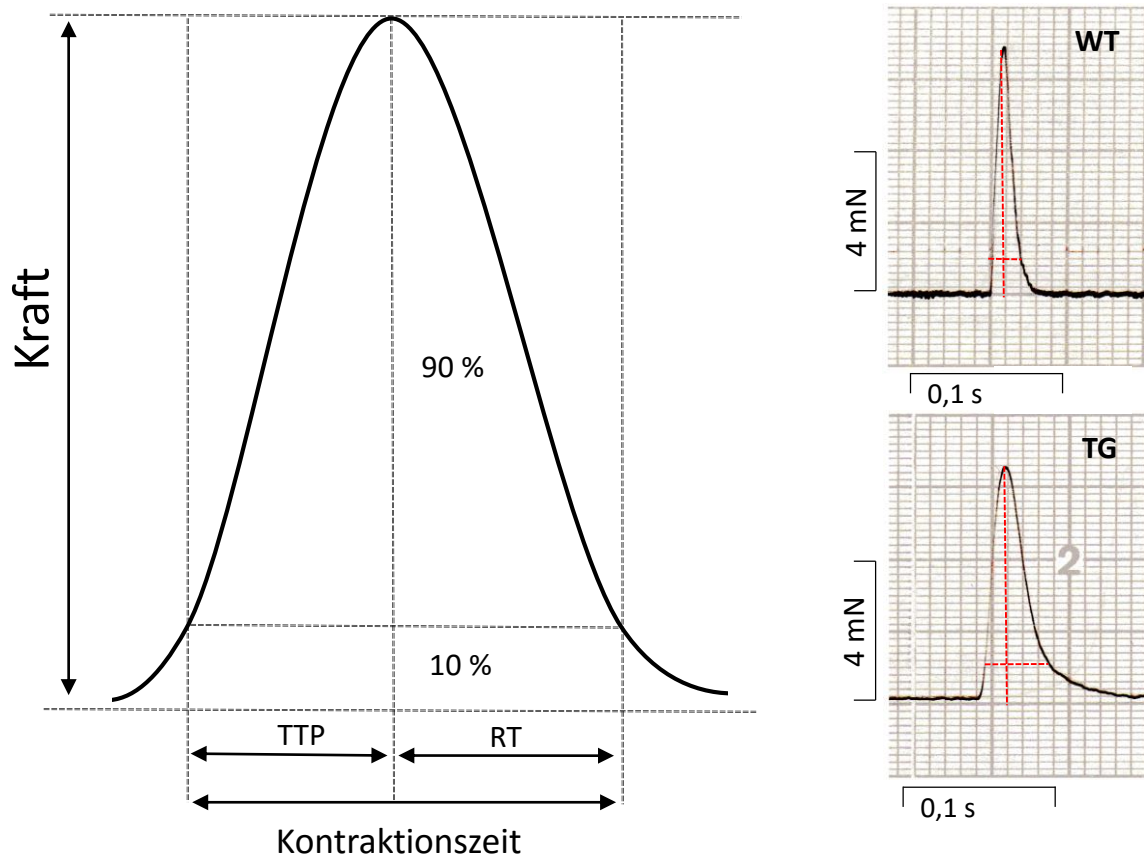


Abb. 14: Schematische Darstellung (A) und Original-Abbildungen (B) von Anspannungs- u. Relaxationszeit einer isometrischen Muskelkontraktion

TTP ("time to peak"), Anspannungszeit; RT ("relaxation time"), Relaxationszeit
Abszisse; Zeit, Ordinate: Kraft

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurde die Anspannungs- und Relaxationszeit unter Basalbedingungen, d. h. ohne vorherige Substanzzugabe, gemessen. Insgesamt wurden unter diesen Bedingungen Daten von 21 Wildtyp-Vorhöfen und 20 transgenen Vorhöfen erhoben.

Die Anspannungszeit unter Basalbedingungen betrug bei WT $35,52 \pm 3,04$ ms und TG $36,54 \pm 3,01$ ms. Ein Unterschied konnte hier weder zwischen WT und TG noch zwischen männlichen und weiblichen Tieren gefunden werden (Abb. 15A).

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Auswertung der Relaxationszeiten unter Basalbedingungen ein Unterschied zwischen der Gruppe der transgenen ($58,75 \pm 12,73$ ms) und der Wildtyp-Mäuse ($48,38 \pm 10,55$ ms). Linke Vorhöfe männlicher transgener Tiere ($59,44 \pm 12,89$ ms) erschlafften langsamer als Präparate männlicher Wildtyp-Mäuse ($47 \pm 9,74$ ms). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei weiblichen transgenen Mäusen ($57,15 \pm 13,41$ ms) keine langsamere Erschlaffung als bei weiblichen Wildtyp-Mäusen ($52,36 \pm 11,64$ ms),

jedoch war ein Trend sichtbar (Abb. 15B). Dies könnte mit der geringeren Anzahl der Präparate (n=6) und der damit höheren Streuung erklärt werden.

Im Folgenden sind die Anspannungszeiten (Abb. 15A), sowie die Relaxationszeiten (Abb. 15B) linker Vorhöfe von Wildtyp-Mäusen und transgenen Tieren dargestellt.

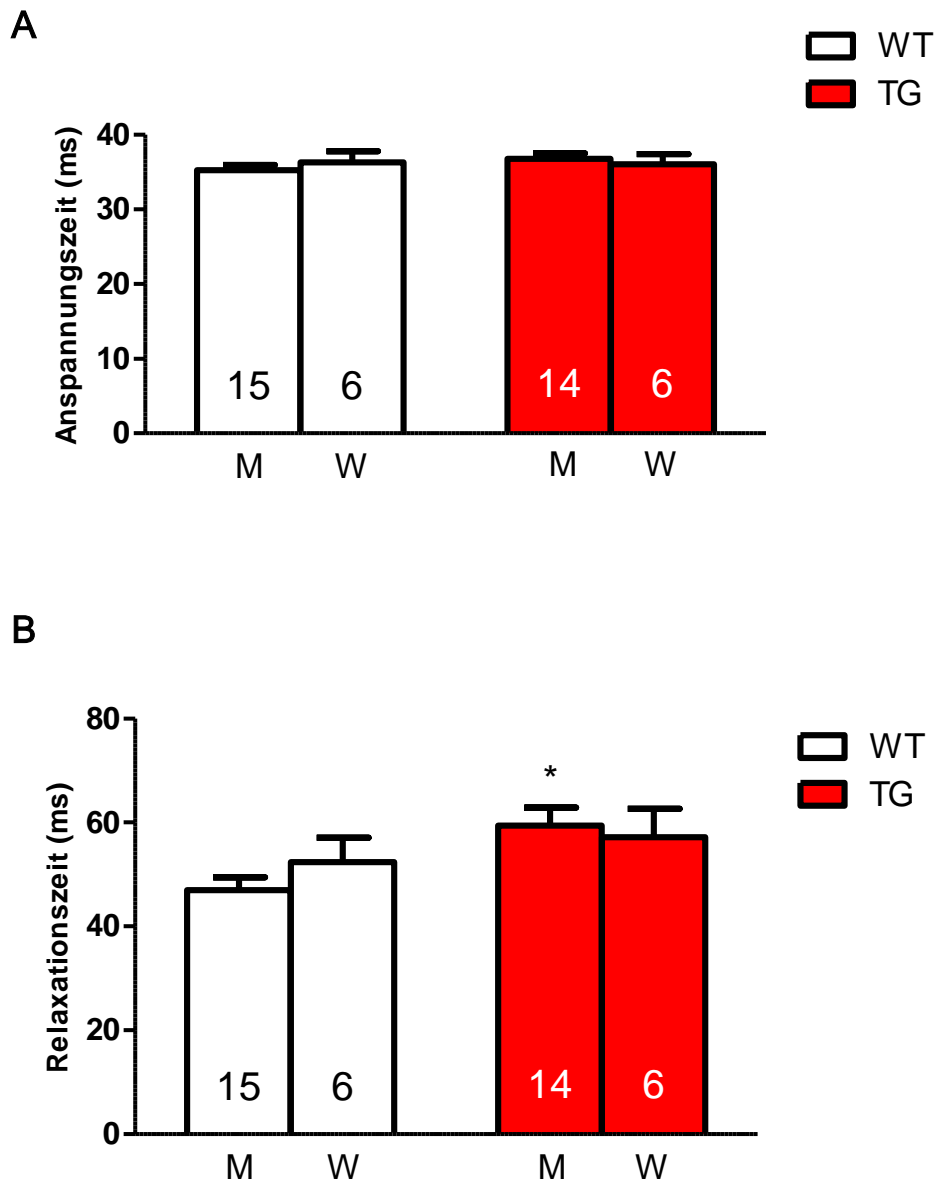


Abb. 15: Anspannungs (A)- und Relaxationszeiten (B) elektrisch gereizter linker Vorhöfe unter Basalbedingungen

Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Tiere an. M, Männchen; W, Weibchen; weiße Säulen, Wildtyp-Mäuse (WT); rote Säulen, transgene Mäuse (TG); * $p < 0,05$ vs. WT
Abszisse: männliche u. weibliche Wildtyp-Mäuse bzw. männliche u. weibliche transgene Mäuse. Ordinate: Anspannungs- bzw. Relaxationszeit in Millisekunden (ms)

Im Verlauf der Versuche wurde auch der Effekt von Aldosteron, Isoprenalin und Kaliumcanrenoat (selektiver Aldosteron-Antagonist) auf die Anspannungs- und Relaxationszeit gemessen. Die Auswertung dieser Messungen erfolgte bei Aldosteron ($n = 18$) und Isoprenalin ($n = 16$) bei einer Konzentration von jeweils 10^{-6} M und bei Kaliumcanrenoat ($n = 4$) bei 10^{-5} M.

Es zeigte sich, dass die Aldosterongabe weder einen Effekt auf die Anspannungszeit (TTP), noch auf die Relaxationszeit (RT) hatte. Dementsprechend zeigte auch Kaliumcanrenoat, welches direkt nach Aldosteron hinzugegeben wurde, keine Unterschiede bei TTP und RT im Vergleich zur Kontrolle. Die Abbildung 16A zeigt, dass linke Vorhöfe unter Aldosteroneinfluss keinen Unterschied in der Anspannungszeit im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe unter Basalbedingungen aufwiesen.

Die Relaxationszeiten, die vor Substanzzugabe gemessen wurden (WT: $48,38 \pm 10,55$ ms, TG: $58,75 \pm 12,73$ ms) veränderten sich unter Aldosteroneinfluss (WT: $50,02 \pm 10,55$ ms, TG: $60,04 \pm 14,02$ ms) nicht. Jedoch war ein Unterschied ($p < 0,05$; ANOVA) in den Erschlaffungszeiten zwischen WT und TG unter Basalbedingungen festzustellen, der auch bei maximaler Aldosteron- (WT: $50,02 \pm 10,55$ ms vs. TG: $60,04 \pm 14,02$ ms) und Isoprenalin-Konzentration (WT: $36,20 \pm 4,06$ ms vs. TG: $44,45 \pm 8,78$ ms) bestehen blieb. (Abb. 16B).

Bei der Betrachtung des Einflusses von Isoprenalin auf die Anspannungs- und Relaxationszeit der Vorhöfe waren Veränderungen ($p < 0,05$) festzustellen. Nach Isoprenalingabe zeigte sich sowohl bei WT ($31,71 \pm 3,33$ ms) als auch bei TG ($31,82 \pm 2,46$ ms) eine verkürzte Anspannungszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT: $35,52 \pm 3,04$ ms, TG: $36,54 \pm 3,01$ ms) (Abb. 16A). Auch die Relaxationszeit hatte sich unter Isoprenalin (WT: $36,2 \pm 4,06$ ms, TG: $44,45 \pm 8,78$ ms) im Vergleich zu den Messungen unter Basalbedingungen (WT: $48,38 \pm 10,55$ ms, TG: $58,75 \pm 12,73$ ms) verkürzt (Abb. 16B).

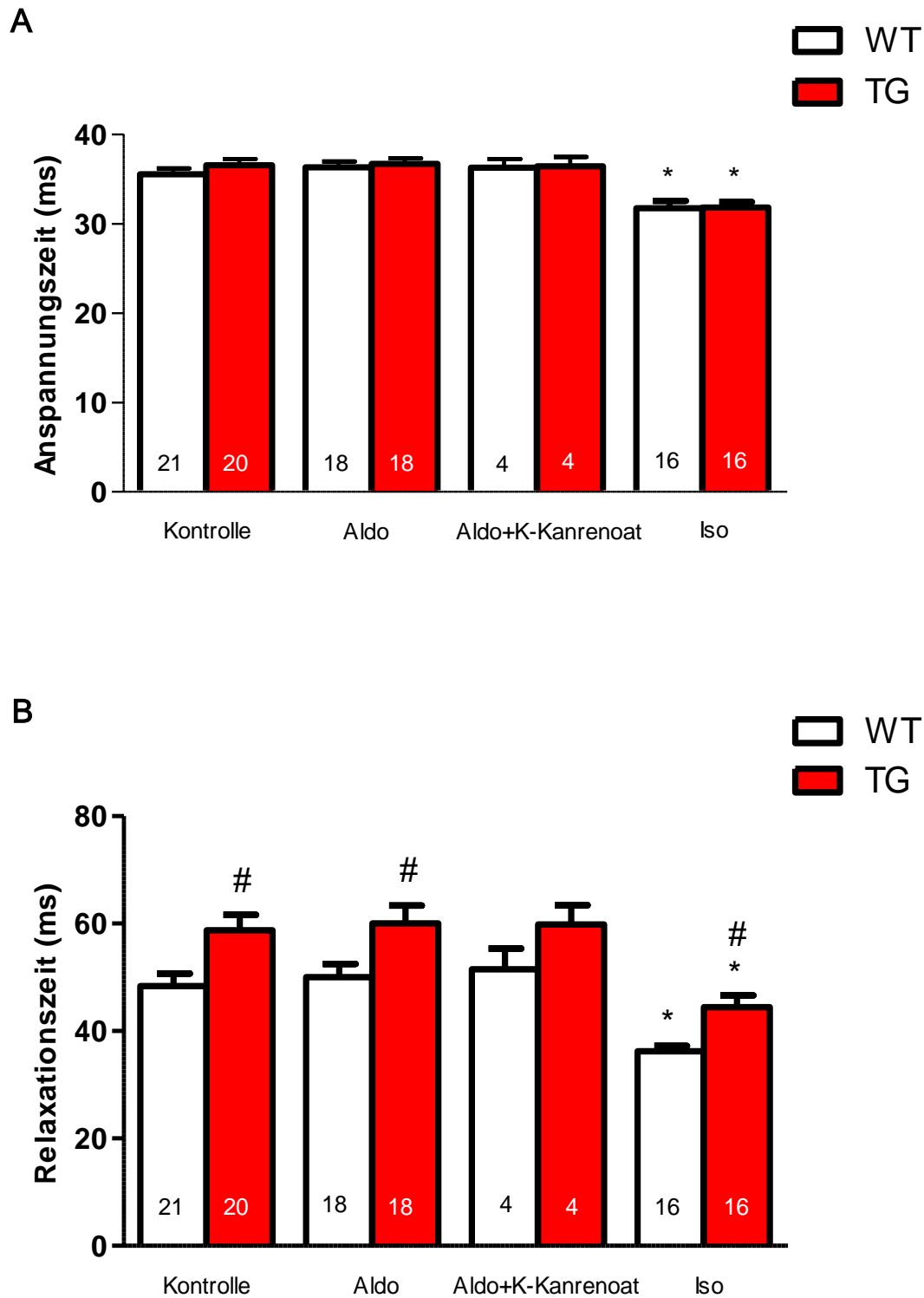


Abb. 16: Anspannungs- (A) und Relaxationszeiten (B) elektrisch gereizter linker Vorhöfe unter Basalbedingungen, Aldosteron- und Isoprenalinstimulation

Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Tiere an. Weiße Säulen, Wildtyp-Mäuse (WT); rote Säulen, transgene Mäuse (TG); * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. WT
 Abszisse: Zugegebene Substanzen Aldosteron (Aldo) 10^{-6} M, K-Kanrenoat 10^{-5} M, Isoprenalin (Iso) 10^{-6} M bzw. Kontrolle (Ktr), Ordinate: Anspannungs- bzw. Erschlaffungszeit in Millisekunden (ms)

4.5 Untersuchungen an rechten Vorhöfen

4.5.1 Frequenzmessung unter Aldosteron- und Isoprenalinstimulation

Nach Präparation der rechten Vorhöfe (siehe Abschnitt 3.5.4) wurde die Schlagfrequenz des Sinusknotens als Mechanogramm aufgezeichnet. Insgesamt wurden 41 Frequenzmessungen (21 WT und 20 TG) unter Basalbedingungen (vor Substanzzugabe), 34 Messungen (20 WT und 14 TG) unter Aldosteroneinfluss, sowie 23 Messungen (13 WT und 10 TG) nach Isoprenaliningabe ausgewertet (Abb. 18).

Die Ausgangsfrequenz der Präparate lag bei Wildtyp-Mäusen im Durchschnitt bei $335,8 \pm 16$ Schlägen pro Minute (bpm) und bei transgenen Tieren bei $300,2 \pm 13,4$ bpm. Diese Basalwerte bildeten die Kontrolle (Ktr) für die anschließende Aldosteron-Konzentrations-Wirkungskurve. Ein Unterschied dieser Ausgangswerte war statistisch nicht festzustellen ($p > 0,05$). Bei der höchsten Konzentration von 10^{-6} M Aldosteron im Organbad zeigte sich weder bei WT noch bei TG (WT: $331,1 \pm 15,2$ bpm, TG: $298,2 \pm 13,8$ bpm) eine Änderung der Schlagfrequenz im Vergleich zur Ausgangsfrequenz (Abb. 17A).

Bei der Auswertung der Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungskurven dienten die Schlagfrequenzen, welche nach dreimaligem Auswaschen mit Tyrode-Lösung und unmittelbar vor der ersten Isoprenaliningabe aufgezeichnet wurden, als Kontrollen. Schon bei der niedrigsten Isoprenalinkonzentration von 10^{-9} M zeigte sich sowohl bei WT ($284,7 \pm 20$ bpm vs. Ktr.: $258,1 \pm 17$ bpm) als auch TG ($317,3 \pm 22,9$ bpm vs. Ktr.: $273,4 \pm 10,8$ bpm) ein Anstieg der Schlagfrequenz ($p < 0,05$). Bei einer Konzentration von 3×10^{-8} M stellte sich bei WT mit Werten von $496,2 \pm 24,9$ bpm und TG mit einer Frequenz von $461,8 \pm 26,4$ bpm ein Frequenzplateau ein. Die Werte blieben bis zur Höchstkonzentration von 10^{-6} M (WT: $469,9 \pm 19$ bpm und TG: 466 ± 24 bpm) auf ähnlich hohen Werten (Abb. 17B).

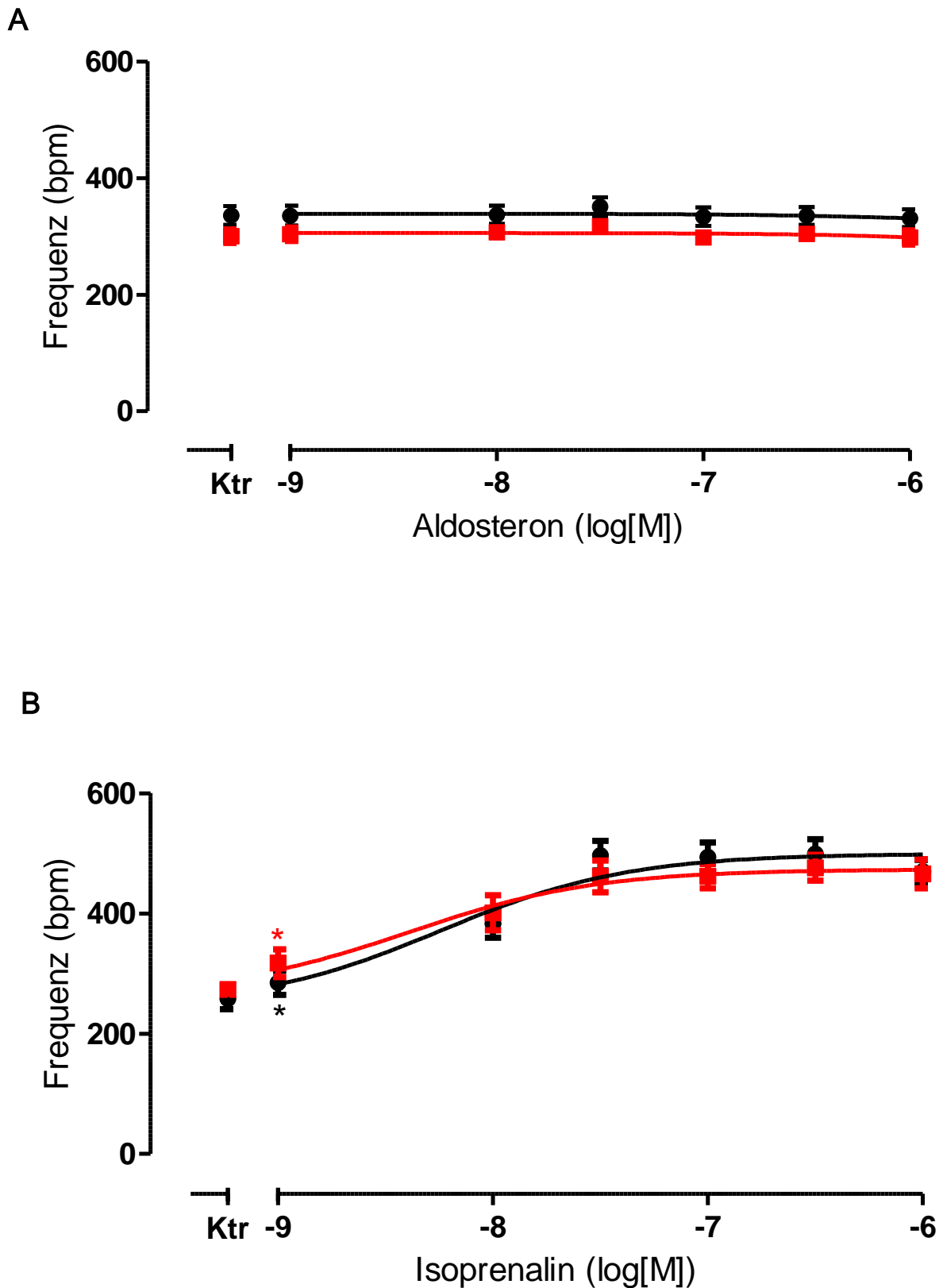


Abb. 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Aldosteron (A) und Isoprenalin (B) bei spontan schlagenden rechten Vorhöfen

Aldosteron zeigt keine Beeinflussung der Schlagfrequenz (A). Im Gegensatz dazu führt Isoprenalin bereits zu einem Anstieg der Schlagfrequenz bei 10^{-9} M (positiv chronotroper Effekt) (B).

Ktr bezeichnet die Kontrolle vor Substanzgabe. * $p < 0,05$ vs. Ktr, $n = 13-21$ (WT), $n = 10-20$ (TG)

Abszisse: Aldosteron (Aldo)- bzw. Isoprenalin (Iso)-Konzentration in log (M); Ordinate: Schlagfrequenz in „beats per minute“ (bpm)

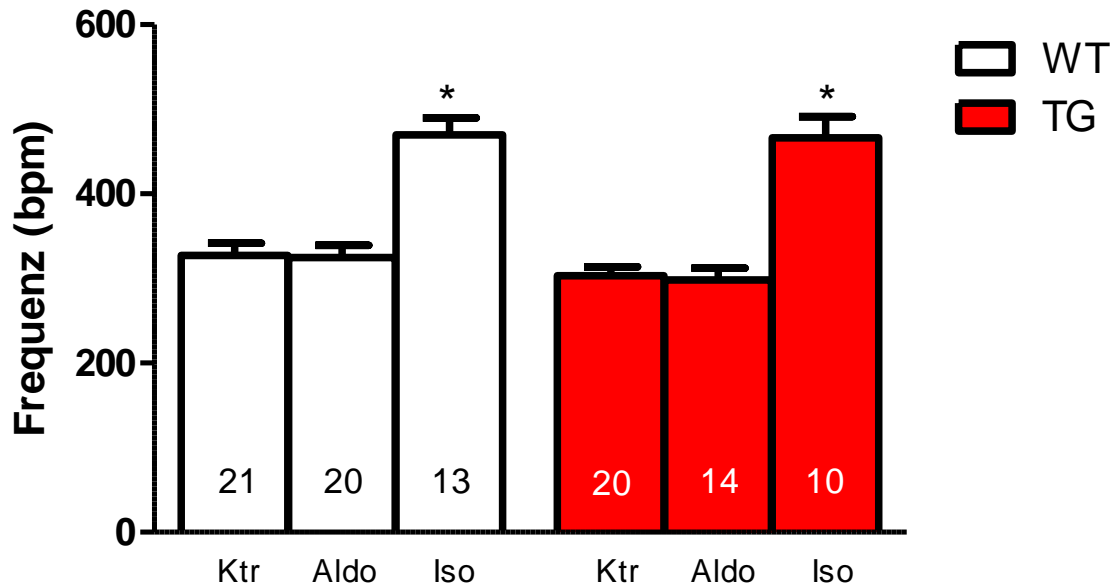


Abb. 18: Übersicht der maximalen Schlagfrequenzen spontan schlagender rechter Vorhöfe

Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Tiere an. Weiße Säulen, Wildtyp-Mäuse (WT); rote Säulen, transgene Mäuse (TG); Ktr, Kontrolle, also Frequenzen unter Basalbedingungen; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Abszisse: Zugegebene Substanzen Aldosteron (Aldo) 10^{-6} M, Isoprenalin (Iso) 10^{-6} M bzw. Kontrolle (Ktr), Ordinate: Schlagfrequenz in „beats per minute“ (bpm)

4.6 Elektrokardiographische Untersuchungen (EKG)

Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, wurden die elektrokardiographischen Untersuchungen mittels bipolarer Ableitung nach Einthoven (I.) an narkotisierten Mäusen durchgeführt. Insgesamt wurden Elektrokardiogramme (EKGs) von 5 Wildtyp-Mäusen und 6 transgenen Tieren ausgewertet. Die Abbildung 19 zeigt Original-EKGs von WT und TG, wie sie durch die Software „Chart 5“ aufgezeichnet wurden. Es zeigte sich kein klares isoelektrisches ST-Segment. Außerdem ist die T-Welle mit dem letzten Teil des QRS-Komplexes verschmolzen. Beides sind für das Maus-EKG typische Eigenschaften (Goldbarg et al. 1968; Berul et al. 1996).

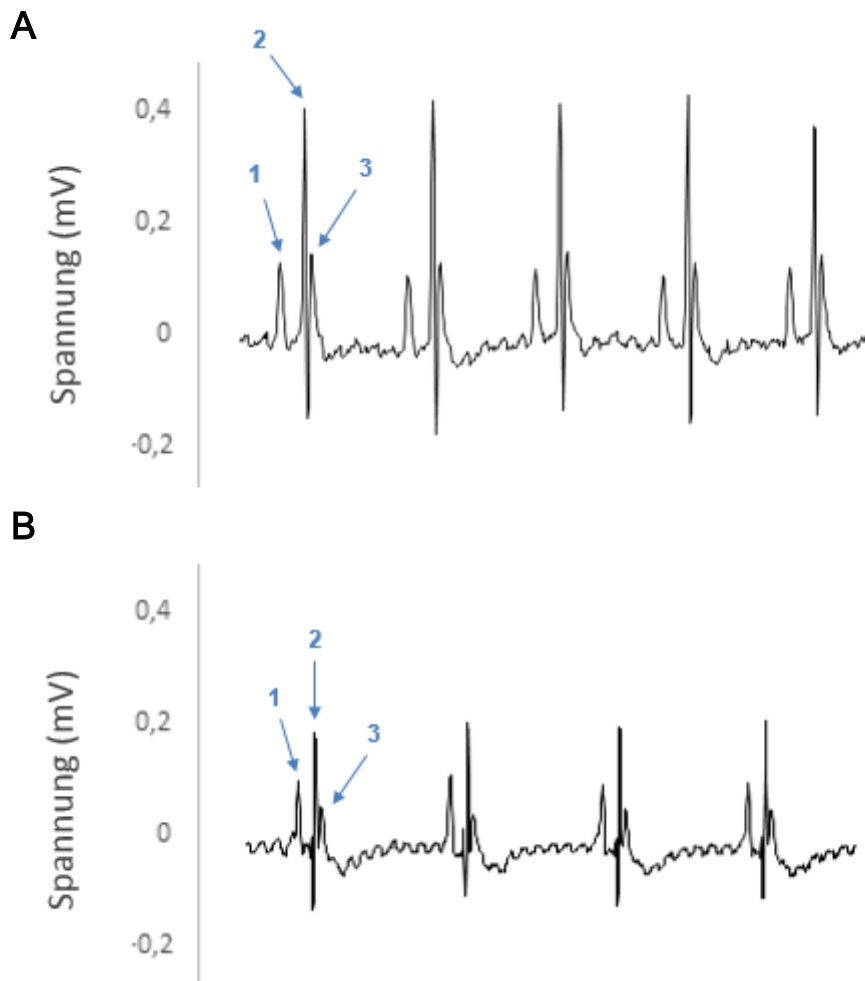


Abb. 19: Original EKG-Aufnahmen einer Wildtyp-Maus (A) und einer transgenen Maus (B)

Die Ableitung der Erregungsausbreitung erfolgte mittels bipolarer Extremitätenableitung nach Einthoven. Beide Abbildungen zeigen Ableitung I. Deutlich zu erkennen sind jeweils die P-Welle (Erregungsausbreitung der Vorhöfe) (Pfeil 1), die R-Amplitude des QRS-Komplexes (Erregungsausbreitung des Ventrikelmyokards) (Pfeil 2) und die ohne ST-Segment direkt aus dem QRS-Komplex hervorgehende T-Welle (Erregungsrückbildung über das Kammermyokard) (Pfeil 3)

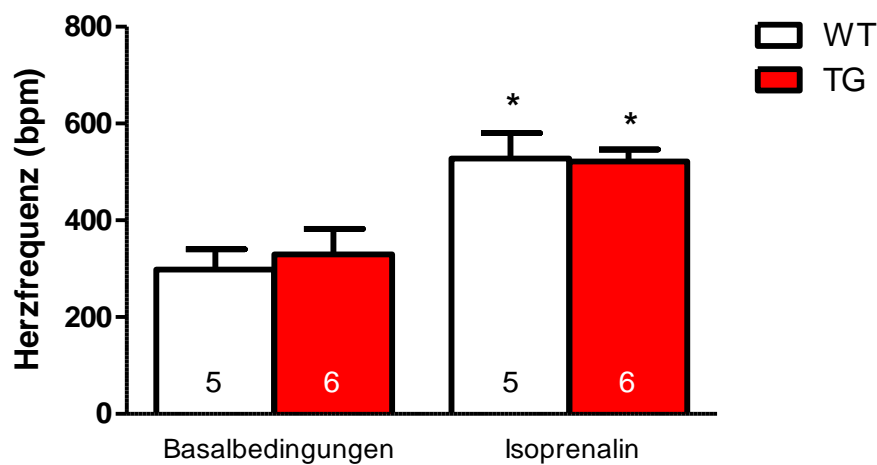
Unter Basalbedingungen wurde eine Herzfrequenz von $298,4 \pm 83,8$ Schlägen pro Minute („beats per minute“, bpm) bei Wildtyp-Mäusen (WT) und $329,6 \pm 128,9$ bpm bei transgenen Mäusen (TG) gemessen. Nach Isoprenalin-Injektion zeigte sich bei WT ($527,6 \pm 105,5$ bpm) und TG ($521,8 \pm 49,6$ bpm) ein gleichwertiger Anstieg der Schlagfrequenz (Abb. 20A) ($p < 0,05$ vs. Basal).

Die P-Welle repräsentiert die Erregungsausbreitung über die Muskulatur der Vorhöfe und markiert damit den Beginn der Vorhofkontraktion (Mann 2014). Die Auswertung dieses Zeitintervalls zeigte unter Basalbedingungen eine Verlängerung der Erregungsausbreitung der Vorhöfe transgener Tiere ($14,87 \pm 2,03$ ms) im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren

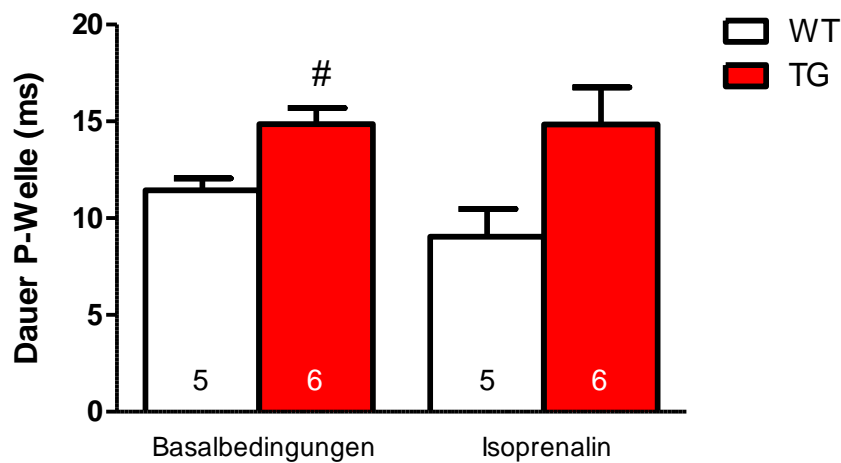
(11, $45 \pm 1,35$ ms). Dieser Unterschied veränderte sich auch nach Isoprenalin-Injektion (TG: $14,85 \pm 4,26$ ms, WT: $9,039 \pm 2,866$ ms) kaum, war jedoch aufgrund der höheren Streuung der Werte statistisch nicht signifikant (Abb. 20B).

Die R-Zacke bestimmt die Höhe des QRS-Komplexes, welcher Ausdruck der Erregungsausbreitung der Kammer ist. Die Größe der R-Zacke korreliert beim Menschen mit der Muskelmasse des Herzens, genauer gesagt der Ventrikel. Sie ist bei Pathologien wie Links- oder Rechtsherzhypertrophie und globaler Hypertrophie vergrößert (Mann 2014). Die Auswertung der Elektrokardiogramme zeigte eine deutlich reduzierte R-Amplitude transgener Tiere ($0,14 \pm 0,13$ mV) im Vergleich zu ihren Wildtyp- Geschwistertieren ($0,42 \pm 0,22$ mV) sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Isoprenalingabe (WT: $0,37 \pm 0,16$ mV und TG: $0,10 \pm 0,09$ mV) (Abb. 20C).

A



B



C

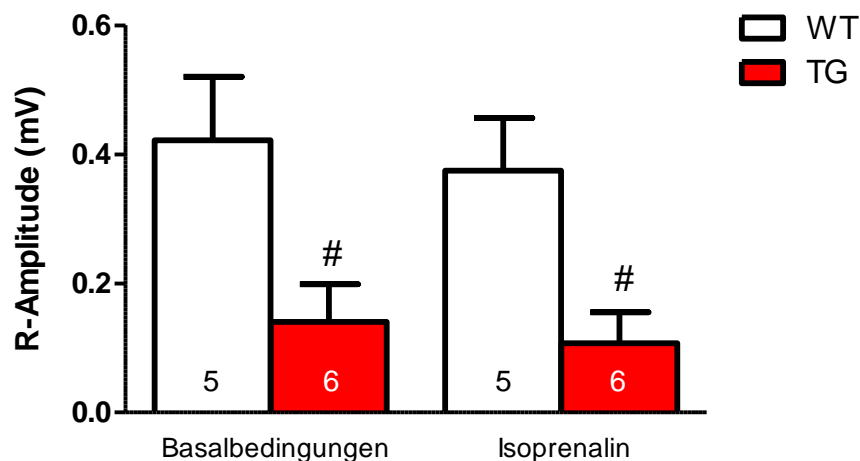


Abb. 20: Auswertung elektrokardiographischer Parameter

A Darstellung der Herzfrequenz. Nach Injektion von Isoprenalin (1 mg/kg Körpergewicht) zeigt sich sowohl bei WT als auch TG ein Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrolle (Basalbedingungen). Ordinate: Herzfrequenz in Schlägen pro Minute („beats per minute“, bpm)

B Dauer der P-Welle. Die P-Welle transgener Tiere dauert sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Isoprenaliningabe länger an als bei Wildtyp-Geschwister. Unter Basalbedingungen zeigt sich dieser Unterschied als statistisch signifikant. Ordinate: Dauer der P-Welle in Millisekunden (ms)

C Vergleich der R-Amplitude zwischen WT und TG. Sowohl unter Basalbedingungen als auch nach Isoprenaliningabe weisen transgene Mäuse eine kleinere R-Amplitude als ihre Wildtyp-Geschwister auf. Ordinate: R-Amplitude in Millivolt (mV)

Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Tiere an. Weiße Säulen, Wildtyp-Mäuse (WT); rote Säulen, transgene Mäuse (TG); * $p < 0,05$ vs. Basalbedingungen (Kontrolle); # $p < 0,05$ vs. WT

Neben der Frequenz, der Dauer der P-Welle und der R-Amplitude wurden weitere EKG-Parameter ausgewertet. Hierunter befanden sich das RR-, QRS-, PR und QT-Intervall sowie die frequenzkorrigierte QT-Zeit (QTc). Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt die Tabelle 3.

Tab. 3: Weitere elektrokardiographische Parameter:

	RR-Interval (ms)	QRS-Interval (ms)	PR-Interval (ms)	QT-Interval (ms)	QTc (ms)
WT basal:	180 ± 30	20 ± 3	30 ± 2	30 ± 2	70 ± 10
Iso:	120 ± 10*	10 ± 1	30 ± 3	30 ± 5	100 ± 10*
TG basal:	190 ± 30	10 ± 3	40 ± 5	30 ± 4	60 ± 10
Iso:	120 ± 10*	10 ± 1	30 ± 3	30 ± 5	70 ± 10 [#]

* $p < 0,05$ vs. basal; [#] $p < 0,05$ vs. WT; n = 5 (WT), 6 (TG)

5 Diskussion

5.1 Bisherige Versuchsmodelle

Einige Modelle zur Untersuchung des humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR) sind in der Literatur bereits beschrieben worden (z.B. Chai et al. 2005). Von diesen Modellen soll im Folgenden das Tiermodell von Ouvrad-Pascaud et al. 2005 näher beleuchtet werden. Dieses erlaubt die kontrollierte Expression des hMR in Herzmuskelzellen der Maus durch die Verwendung des sogenannten TET-Systems. Durch dieses System kann die Aktivität eines eingeschleusten Gens durch die Gabe des Antibiotikums Tetrazyklin an- oder abgeschaltet werden. Es basiert auf dem Tetrazyklin-Repressor TetR sowie seiner spezifischen Operator-Binde-Sequenz TetO. In Abwesenheit des Induktors Tetrazyklin verhindert die Bindung des Repressors an seinen Operator die Aktivierung des Promotors. In Gegenwart steigender Tetrazyklin-Konzentrationen dagegen wird diese Protein-DNA-Interaktion dosisabhängig geschwächt und somit die Genexpression, in diesem Fall des hMR, wiederhergestellt (Bujard 1999; Saenger et al. 2000; Puttini et al. 2001; Ouvrad-Pascaud 2005).

Dies hat einerseits den Vorteil, dass jede transgene Maus, je nach Vorbehandlung mit Tetrazyklin, auch als ihre eigene Kontrolle dienen kann. Die Analyse des Rezeptors kann vorgenommen werden, ohne dass der Aldosteron-Plasma-Spiegel beeinflusst werden muss. Andererseits kann die Zeitspanne der hMR-Überexpression genau festgelegt werden. Mit Hilfe des TET-Systems hätte z.B. die transkriptionelle Aktivität des α MHC-Promotors während der Embryonalentwicklung (Gulick et al. 1991; Ng et al. 1991), die in der vorliegenden Arbeit eventuell für den letalen Phänotyp verantwortlich war, erst im Erwachsenenalter der Maus induziert werden können. Damit wäre eine Etablierung der hMR-Linie möglicherweise zu realisieren gewesen. Insbesondere da der Versuch einer MR-Blockade mittels Spironolacton-Gabe an das Zuchtweibchen die erhöhte Sterblichkeit hMR-überexprimierender Nachkommen nicht verhindern konnte. Ob der Zeitpunkt der Gabe zu spät in der Entwicklung der Feten oder in zu geringer Dosis erfolgte, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Die Untersuchungen von Ouvrad-Pascaud et al. 2005 führten zu ähnlichen Erkenntnissen wie in der vorliegenden Arbeit. Auch diese Forschergruppe stellte eine erhöhte Sterblichkeit von hMR-überexprimierenden Mäusen fest, die jedoch durch die Gabe von Spironolacton an das Zuchtweibchen verhindert werden konnte (Ouvrad-Pascaud 2005). Ergebnisse über die Untersuchung des Aktionspotentials von Ouvrad-Pascaud et al. bieten einen möglichen Mechanismus für die verlängerte Relaxationszeit (Abschnitt 5.3) und die verbreiterte P-Welle (Abschnitt 5.5.1) transgener Mäuse der vorliegenden Arbeit.

Zusammenfassend kann man sagen, dass viele Versuchsmodelle auf der Überexpression des hMR basieren, der nach Aldosteron-Stimulation sowohl auf molekularer Ebene, z.B. durch Untersuchung der Genexpression (Lalevee et al. 2005; Turchin et al. 2006), auf elektrophysiologischer Ebene durch EKG-Untersuchungen und Analysen von Ionenströmen (Benitah et al. 2001; Mihailidou et al. 2004; Ouvrard-Pascaud 2005), als auch im Rahmen von Organbadversuchen (Chai et al. 2005) auf makroskopischer Ebene untersucht wurde. Auch hMR-Knockout-Modelle sind in der Literatur beschrieben worden. Diese beruhen entweder auf der Expression von Antisense-mRNA gegen den hMR (Beggah et al. 2002; Ouvrard-Pascaud und Jaisser 2003) oder auf der Deletion bestimmter DNA-Sequenzen, welche für die Rezeptorfunktion essenziell sind (Berger et al. 1998; Haseroth et al. 1999).

Im Gegensatz zu den genannten Versuchsmodellen werden allein in der vorliegenden Arbeit Aldosteron-Effekte an Herzmuskelzellen mit Hilfe eines MR-Konstruktes untersucht, welches ausschließlich nicht-genomische Effekte vermittelt (hMR^{DEF}) (Grossmann et al. 2008), und auf diese Weise eine Differenzierung des dualen Wirkmechanismus von Aldosteron (genomisch – nicht-genomisch) berücksichtigt. Die erfolgreiche Klonierung dieses hMR^{DEF}-Konstruktes konnte durch Genotypisierung (Abschnitt 4.1), bzw. dessen Expression mit Hilfe immunhistologischer Untersuchungen (Abschnitt 4.2), nachgewiesen werden. Die separate Untersuchung des nicht-genomischen Signalweges stellt ein nützliches Hilfsmittel für weitere Forschungen dieses Signalweges dar und kann eventuell auch in zukünftigen Versuchen einige wissenschaftliche Lücken auf diesem Gebiet schließen.

5.2 Untersuchung der Kraft

5.2.1 Nicht-genomischer Weg und beteiligter Rezeptor

Die Versuche dieser Arbeit zeigen, dass Aldosteron auf primär nicht-genomischem Wege negativ inotrop auf linke Mäusevorhöfe wirkt. Dass dieser Effekt nicht über Transkriptions- und Translationsvorgänge, also nicht-genomisch, abläuft, ist mit dem kurzen Zeitintervall zu begründen, in dem die Kraftabnahme zu beobachten war. In dieser Arbeit kam es innerhalb weniger Minuten zu einem negativ inotropen Effekt. Dies deckt sich u.a. mit den Erkenntnissen von Chai et al. 2005, welche ebenfalls in Organbad-Versuchen nach Aldosterongabe ein Nachlassen der Kraft humaner Vorhoftrabekel innerhalb von 5 - 15 Minuten nachweisen konnten. Da dieser Effekt weder durch Spironolacton noch durch Eplerenon (beides kompetitive Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten) inhibiert werden konnte (Chai et al. 2005), ist bei diesem Effekt nicht von der Beteiligung des klassischen

Mineralokortikoid-Rezeptors (MR) auszugehen (Grossmann et al. 2005). Die Kraftabnahme muss somit über einen nicht-genomischen MR-unabhängigen Signalweg abgelaufen sein. Für diese Annahme spricht auch, dass in den Kontraktionsversuchen dieser Arbeit kein Unterschied in der Kontraktionskraft zwischen WT und TG nach Aldosteron-Gabe gefunden werden konnte. Die überexprimierten trunkierten Mineralokortikoid-Rezeptoren (hMR^{DEF}) der transgenen Mäuse scheinen also keinen Einfluss auf die Kontraktionskraft zu haben. Die Identität dieses MR-unabhängigen Rezeptors ist noch weitgehend unklar. Diskutiert wird die sogenannte Membranhypothese, nach der Mineralokortikoid-Rezeptoren auch an der Zellmembran zu finden sind (Ziera et al. 2009; Meinel et al. 2014) und primär nicht-genomische Effekte über Interaktion mit zytosolischen Signalkaskaden vermitteln (Haserath et al. 1999). So gibt es z.B. Hinweise auf eine Kollokalisierung von MR-Fragmenten und dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) an der Plasmamembran, welche zu einer Transaktivierung des EGFR führt und damit intrazelluläre Signalkaskaden (z.B. durch Phosphorylierung von ERK 1/2) beeinflusst (Grossmann et al. 2010). Es ist bereits bekannt, dass auch Östrogen-, Androgen- und Glukokortikoid-Rezeptoren ihre nicht-genomische Wirkung zumindest teilweise über eine Lokalisation in oder an der Zellmembran vermitteln (Zhu et al. 2003; Orshal und Khalil 2004; Maggiolini und Picard 2010; Burge et al. 2013).

5.2.2 Mögliche Signalkaskade und Zielproteine

Da der nicht-genomische negativ inotrope Effekt von Aldosteron durch den Protein-Kinase-C (PKC)-Inhibitor Chelerythrin blockiert werden konnte, ist von einer Beteiligung eines PKC-Signaltransduktionsweges auszugehen (Mihailidou et al. 2004; Chai et al. 2005; Alzamora et al. 2007). Weiterhin konnte an isolierten Kardiomyozyten eine Beeinflussung der Na⁺-K⁺-ATPase durch Aldosteron über den PKCε-Weg gezeigt werden. Danach erhöht Aldosteron innerhalb von 15 Minuten die Na⁺ /K⁺ /2Cl⁻-Kotransporter-Aktivität, was zu einer erhöhten intrazellulären Na⁺-Konzentration mit sekundärer Steigerung der Na⁺-K⁺-ATPase-Aktivität führt. Diese Effekte konnten durch den PKCε-Inhibitor blockiert und durch das PKCε-Aktivator-Peptid imitiert werden. Actinomycin D (ein Transkriptions-Inhibitor) hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase, was einen primär nicht-genomischen Wirkmechanismus wahrscheinlich macht (Mihailidou et al. 2004).

Diese erhöhte Aktivität der Na⁺-K⁺-Pumpe stellt einen möglichen Mechanismus für eine verringerte Kontraktionskraft dar (Chai et al. 2005), insbesondere, da der gegenteilige Mechanismus, nämlich die Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase durch Herzglykoside (z.B. Digitalis, Digitoxin), zu einem positiv inotropen Effekt führt. Danach führt die Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase dazu, dass mehr Na⁺ in der Zelle verbleibt, was wiederum eine Annäherung der intrazellulären und extrazellulären Natriumkonzentration mit sich bringt. Dies nimmt

dem Natrium-Kalzium-Austauscher das notwendige Konzentrationsgefälle für den Kalziumtransport aus der Zelle. Kalzium verbleibt vermehrt in der Zelle und steigert die Kontraktilität (Fozzard und Sheets 1985; Mann 2014).

Abbildung 21 stellt eine Zusammenfassung einer durch Aldosteron induzierten möglichen Signalkaskade dar.

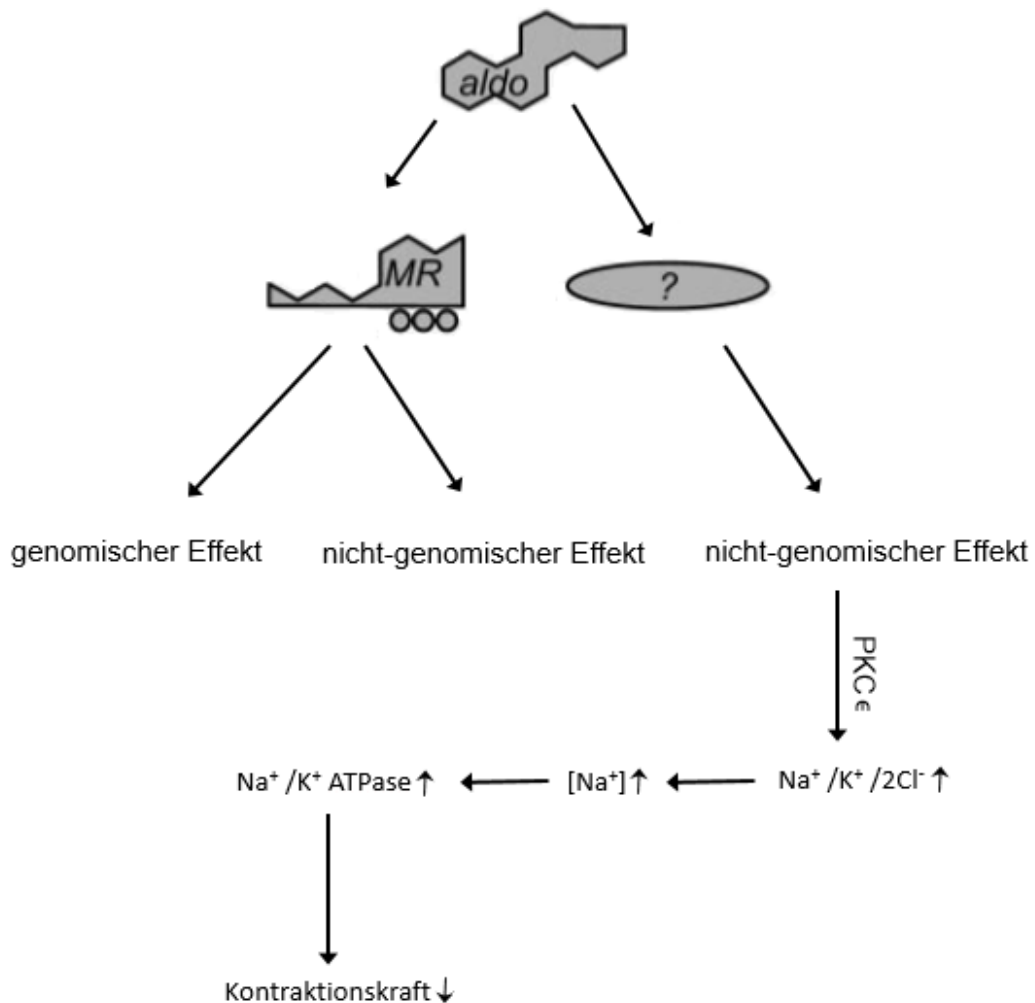


Abb. 21: Schema von Rezeptor und möglicher Signalkaskade für eine schnelle Kontraktionskraftminderung durch Aldosteron

Es scheinen drei verschiedene Aldosteron-abhängige Signalwege zu existieren: 1) der klassische, MR-abhängige Signalweg, welcher zur Expression sogenannter „Aldosteron-induzierter Proteine“ führt; 2) ein schneller primär nicht-genomischer, aber MR-abhängiger Signalweg; 3) ein schneller primär nicht-genomischer, MR-unabhängiger Signalweg (Grossmann et al. 2005).

Eine durch Aldosteron induzierte und durch die PKCε vermittelte Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ -Kotransporters führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Na^+ -Konzentration und damit sekundär zu einer Steigerung der Na^+/K^+ -ATPasen-Aktivität (Mihailidou et al. 2004). Dies stellt einen möglichen Mechanismus für eine Kontraktionskraftabnahme dar (Chai et al. 2005).

5.2.3 Beurteilung der Kontraktionsexperimente

Die Kontraktionsexperimente wurden an isolierten Vorhöfen durchgeführt. Es muss in Betracht gezogen werden, dass sich die Eigenschaften eines kompletten Herzens von denen isolierter Vorhöfe unterscheiden. Eine Aussage über die Eigenschaften der Herzkammern kann nicht gemacht werden. Außerdem kann eine durch die Präparation bedingte Schädigung der Vorhöfe zu unterschiedlichen kontraktiven Eigenschaften, z.B. einer verringerten Ausgangskraft, führen. Auch die basale Herzfrequenz und die Entwicklung von Arrhythmien sind von der Präparation abhängig. Allerdings würden diese Fehler sowohl bei WT als auch bei TG auftreten.

Da Substanzen, die zu einer Veränderung der Herzfrequenz führen, auch die Kontraktionskraft beeinflussen (Anderson et al. 1973; Vila-Petroff et al. 2003), wurden die Untersuchungen getrennt an spontan schlagenden rechten Vorhöfen (Messung der Frequenz) und elektrisch stimulierten linken Vorhöfen (Messung der Kraft) durchgeführt. Dies erlaubte eine Untersuchung der Kraft ohne chronotrope Beeinflussung bzw. eine Untersuchung der Frequenz ohne inotrope Manipulation. Wie in Abschnitt 3.5.5 bereits beschrieben, wurde die Reihenfolge von Ethanol- und Aldosteron-Konzentrations-Wirkungskurven nach der Hälfte der Versuche vertauscht, um Fehlinterpretationen durch mögliche Erschlaffungseffekte der Präparate zu verhindern. Dies sorgte für vergleichbare Bedingungen der eingehängten Präparate bei den Kontraktionsversuchen mit Ethanol und Aldosteron. Ein möglicher Erschlaffungseffekt des Muskels über die Zeit ist also bei beiden Kontraktionsmessungen in gleichem Maße berücksichtigt. Kontraktionsversuche mit Isoprenalin am Ende jedes Messprotokolls dienten der Qualitätskontrolle der Präparate. Das starke Ansprechen der Präparate auf Isoprenalin (positiv inotroper Effekt) deutet auf Intaktheit der Gewebe hin.

Die Abnahme der Kontraktionskraft lag in dieser Arbeit bei WT und TG bei 1 μ M Aldosteron bei über 10 %. Ein Wert, der im Vergleich zu den Ergebnissen der Organbad-Versuche von Chai et al. 2005, die eine Abnahme der Kraft humaner Vorhoftrabekel von 34 % bei der gleichen Aldosteron-Konzentration gefunden haben (Chai et al. 2005), weniger eindrucksvoll zu sein scheint. Eine mögliche Ursache der deutlicheren Kraftabnahme beim Menschen könnte durch eine höhere Rezeptoren-Dichte im Vergleich zur Maus begründet sein. Selbst Unterschiede in der Rezeptoren-Dichte innerhalb einer Spezies könnten zu unterschiedlich inotropen Eigenschaften führen. So stellten Chai et al. bei ventrikulären Präparaten lediglich eine Kraftabnahme von 15 % fest (Chai et al. 2005).

Ungeachtet dessen ist auch die Kraftabnahme, die in dieser Arbeit gefunden wurde, möglicherweise bedeutsam, gerade da pathologisch hohe Aldosteronspiegel bei herzinsuffizienten Patienten trotz leitliniengerechter Medikation bestehen (Staessen et al. 1981; Rousseau et al. 1994; Jorde 2002; Phelan et al. 2012) und somit neben anderen

ungünstigen Aldosteron-Einflüssen wie Inflammations- und Remodelingvorgängen (Rocha et al. 2002; Blasi et al. 2003; Namsolleck und Unger 2014) zu einer Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion beitragen können.

Es muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass auch akute positiv inotrope Effekte von Aldosteron in der Literatur beschrieben worden sind. So konnten z.B. Barbato et al. 2002 innerhalb von vier Minuten nach Aldosteron-Gabe eine Kraftzunahme bei nach Langendorff-Neely-Technik perfundierten Rattenherzen beobachten (Barbato et al. 2002). Die uneinheitliche Quellenlage zeigt die Komplexität nicht-genomischer Aldosteron-Effekte sowie die Vielzahl an Faktoren, die letztendlich die Zellantwort bestimmen. So berichtet Tanz über verschiedene Mineralokortikoide, die je nach applizierter Konzentration sowohl negativ als auch positiv inotrope Effekte zeigen (Tanz 1963). Wehling et al. beobachteten im Rahmen einer klinischen Studie drei Minuten nach intravenöser Aldosteron-Applikation eine Abnahme der Herzauswurfleistung, die jedoch nach zehn Minuten fast wieder ihren Ausgangswert erreicht hatte (Wehling et al. 1998). Auch scheint es einen Spezies-abhängigen Unterschied in der Beeinflussung der Kontraktionskraft zu geben, der möglicherweise durch Aldosteron induzierte pH-Wert-Veränderungen zustande kommt (Matsui et al. 2007). So führt Aldosteron in Herzmuskelzellen vom Meerschweinchen zu einer Erhöhung des pH-Wertes, während es zu keinen Veränderungen bei Herzmuskelzellen der Ratte kommt (Matsui et al. 2007). Somit müssen bei Untersuchungen von Aldosteron-Effekten immer auch Speziesunterschiede berücksichtigt werden.

5.3 Untersuchung der Muskelrelaxationszeit

5.3.1 Sekundär genomischer Signalweg

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Relaxation einer isometrischen Muskelkontraktion bei linken Vorhöfen transgener Mäuse länger andauert als bei ihren Wildtyp-Geschwistertieren. Dieser Unterschied zeigte sich bereits unter Basalbedingungen, also ohne vorherige Gabe einer Testsubstanz. Die verlängerte Relaxationszeit der transgenen Vorhöfe lässt daher einen genomischen Effekt vermuten, zumal eine für nicht-genomische Signalwege typische schnell einsetzende Veränderung der Relaxationszeit nach Aldosteron-Gabe nicht beobachtet werden konnte.

Der Umstand, dass nur Vorhöfe von transgenen Tieren eine verlängerte Relaxationszeit aufwiesen, kann durch folgende Überlegung begründet werden. Sowohl WT als auch TG besitzen vermutlich die gleiche Dichte von nicht mutierten endogenen Aldosteron-Rezeptoren (hMR), also Rezeptoren, die in der Lage sind, in den Zellkern zu wandern und

als Transkriptionsfaktor primär-genomische Effekte zu vermitteln. Transgene Mäuse besitzen zusätzlich überexprimierte humane Aldosteron-Rezeptoren (hMR^{DEF}), die jedoch aufgrund des Fehlens der DNA-Bindedomäne keine primär-genomischen Effekte vermitteln können (Grossmann et al. 2008). Die verlängerte Relaxationszeit dieser Tiere könnte damit erklärt werden, dass die Bindung von Aldosteron an die überexprimierten „DEF-Rezeptoren“ zu einer sekundär-genomischen Antwort geführt hat. Das bedeutet eine Induktion genomischer Signalwege durch einen primär nicht-genomischen Signalweg (Grossmann und Gekle 2009; Sinphitukkul et al. 2011). Ein Beispiel für eine solche Interaktion stellt die durch Aldosteron über den PKC α -Weg vermittelte Phosphorylierung des Mineralokortikoid-Rezeptors dar, welcher durch diesen Vorgang aktiviert wird (Le Moellic et al. 2004).

5.3.2 Möglicher Mechanismus und Zielproteine

Vermutungen über den Mechanismus der verlängerten Relaxationszeit transgener Tiere lassen sich anhand der Untersuchungen von Bénitah et al. anstellen. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass es nach 24-stündiger Aldosteron-Inkubation von Herzmuskelzellen zu einer Verlängerung des Aktionspotentials (AP), bedingt durch eine verlängerte Erregungsrückbildung (Repolarisation), kommt. Dieser durch Aldosteron induzierte genomische Effekt beruht auf einem verringerten K⁺-Ausstrom aus der Zelle, welcher durch eine verminderte K⁺-Kanal (I_{to1})-Expression zustande kommt. Da die Repolarisation im Wesentlichen durch den K⁺-Ausstrom geprägt ist, kommt es zu einer Verlängerung der Repolarisationszeit des AP. Der Mechanismus der verringerten K⁺-Kanal (I_{to1})-Expression ist noch weitgehend unklar. Vermutet wird zur Zeit eine über Ca²⁺ vermittelte Beeinflussung der Genexpression (Benitah et al. 2001; Ouvrard-Pascaud 2005; Knollmann et al. 2007). Die Verlängerung des Aktionspotentials durch Aldosteron-Einfluss konnte 2005 bei hMR-überexprimierenden Mäusen bestätigt werden. Auch diese Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren eine durch einen verminderten K⁺-Ausstrom verlängerte Erregungsrückbildung (Ouvrard-Pascaud 2005) (Abb. 22A).

Die Aldosteron-induzierte Verlängerung der Repolarisationszeit lässt sich durchaus mit den Ergebnissen der verlängerten Relaxationszeit, welche in dieser Arbeit gefunden wurde, in Einklang bringen. Die Relaxationszeit einer Muskelkontraktion ist entscheidend vom Kaliumstrom (I_K) während der Repolarisation abhängig. Wenn der K⁺-Ausstrom verringert ist, bleibt das Gleichgewicht zwischen Ca²⁺-Einstrom und K⁺-Ausstrom während der Plateauphase länger erhalten (siehe Wirkmechanismus Klasse III-Antiarhythmika). Der die Plateauphase bestimmende langsame Ca²⁺-Einstrom durch die L-Typ Ca²⁺-Kanäle bleibt

länger erhalten und führt durch Bindung an myofibrilläre Regulatorproteine (Troponin C) zu einer verlängerten Aktivierung des kontraktile Apparates (Knollmann et al. 2007; Hilal-Dandan et al. 2014). Die Muskelkontraktionszeit steigt an (Abb. 22B).

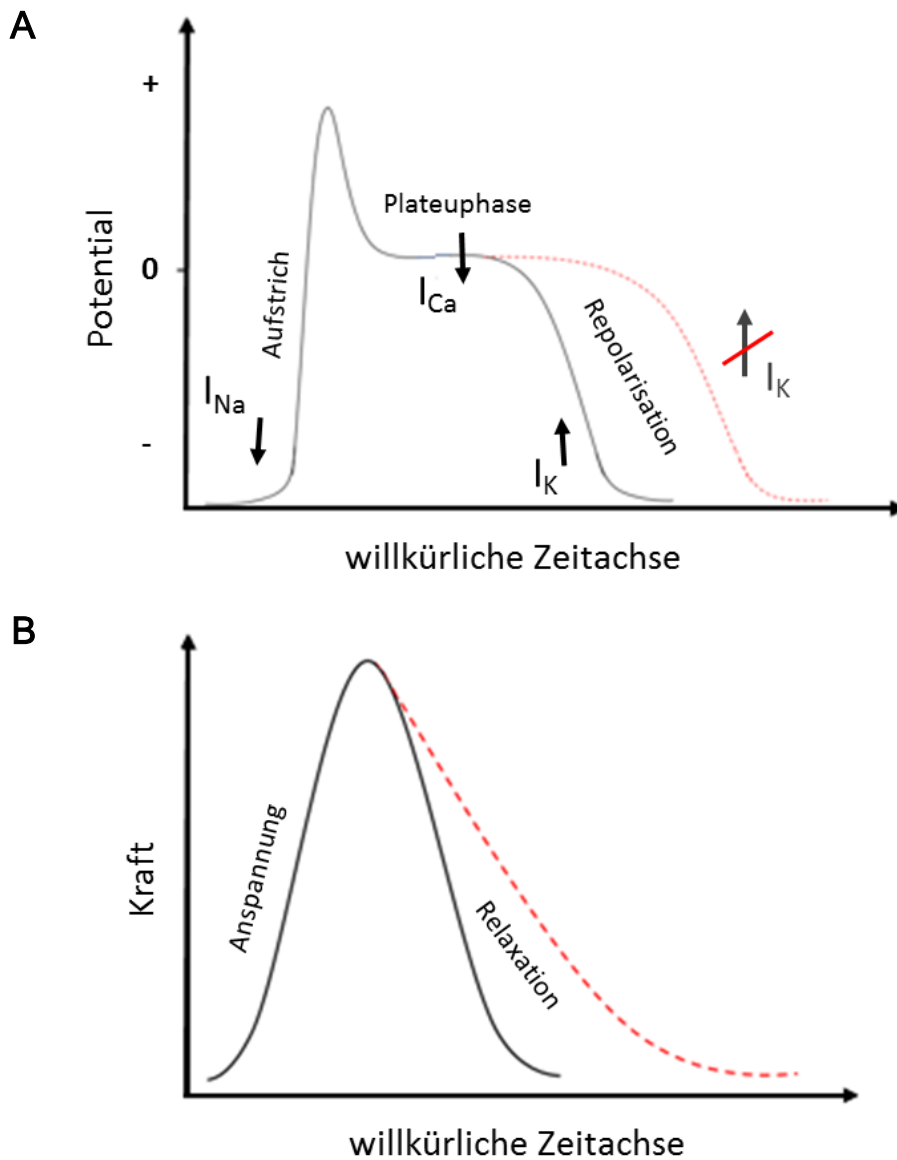


Abb. 22: Schematische Darstellung von Aktionspotential (A) und Muskelkontraktion (B) bei unterschiedlichen Kaliumströmen

A Darstellung eines Aktionspotentials. Durch einen spannungsabhängigen schnellen Natriumeinstrom (I_{Na}) kommt es zum initialen Aufstrich. Nachdem das Membranpotential einen positiven Wert erreicht hat („overshoot“), schließt sich eine frühe partielle Repolarisation an. Die folgende Plateauphase (Membranpotential bei etwa 0 mV) ist durch ein Gleichgewicht zwischen dem repolarisierenden K^+ -Ausstrom (I_K) und dem langsamen Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) der L-Typ-Kalzium-Kanäle charakterisiert. Die Repolarisation wird durch das Überwiegen von nach auswärts gerichteten K^+ -Strömen (I_K) eingeleitet. Unter Aldosteron-Einfluss verringert sich der K^+ -Ausstrom, so dass das Gleichgewicht zwischen Ca^{2+} -Einstrom und K^+ -Ausstrom länger aufrechterhalten bleibt (rote gestrichelte Linie). Sowohl Repolarisation als auch Plateauphase verlängern sich (die Pfeile zeigen die Stromrichtung des betreffenden Ions an) (Hilal-Dandan et al. 2014).

B Darstellung einer isometrischen Muskelkontraktion. Der während der Plateauphase erhöhte Ca^{2+} -Einstrom durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle triggert den Ca^{2+} -Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Das freie zytosolische Kalzium steigt an und bindet an die myofibrillären Regulatorproteine (Troponin C), was zu einer Aktivierung des kontraktile Apparates führt. Der durch Aldosteron induzierte verminderte K^+ -Ausstrom führt zu einem längeren Verweilen von Ca^{2+} in der Zelle. Dies hat eine länger anhaltende Kontraktion mit verlängerter Relaxationszeit zur Folge (rote gestrichelte Linie) (Hilal-Dandan et al. 2014).

Zusammenfassend ist also die verlängerte Relaxationszeit bei linken Vorhöfen transgener Mäuse unter chronischem Aldosteron-Einfluss vermutlich Ausdruck einer verlängerten Repolarisation auf Aktionspotentialebene. Die elektrochemischen Abläufe eines menschlichen und eines murinen Aktionspotentials weisen große Ähnlichkeiten auf (Knollmann et al. 2007), so dass die hier beobachteten Veränderungen möglicherweise auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz zum Tragen kommen, die eine erhöhte Plasma-Aldosteron-Konzentration aufweisen (Jorde 2002). Dies könnte einen zusätzlichen Pathomechanismus der Herzinsuffizienz darstellen. Zukünftige Untersuchungen an dem hier verwendeten Tiermodell, wie eine Blockade des MR z.B. durch längere Vorbehandlung mit Spironolacton oder der Einsatz von Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D, könnten eine Normalisierung der Relaxationszeit zeigen und damit die Ergebnisse erhärten. Der Nutzen der Aldosteron-Rezeptor-Blockade durch Eplerenon und Spironolacton bei Patienten mit Herzinsuffizienz konnte bereits belegt werden (Pitt et al. 1999, 2003; Phelan et al. 2012; Namsolleck und Unger 2014). Außerdem sollten in zukünftigen Untersuchungen die K^+ -Kanalexpression und kardiale Aktionspotentiale bestimmt werden.

Ein weiterer Mechanismus, der wesentlichen Einfluss auf die Relaxationszeit hat, sind das Herauspumpen des zytosolischen Ca^{2+} in den Extrazellulärraum und die Wiederaufnahme in seinen zellulären Speicher, das sarkoplasmatische Retikulum (SR). Durch Absinken der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol nimmt die Bindung von Ca^{2+} an das myofibrilläre Regulatorprotein Troponin C ab, wodurch die Aktivierung des kontraktile Apparates beendet wird. Das vom extrazellulären Medium zuvor eingeströmte Ca^{2+} wird hauptsächlich über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher hinaus transportiert. Die Rückführung in das freie sarkoplasmatische Retikulum erfolgt über die sarkoendoplasmatische Retikulum-ATPase (SERCA), die in der Membran des SR in hoher Dichte vorhanden ist. Die SERCA ist durch das Regulatorprotein Phospholamban reguliert. Dieses stellt einen Inhibitor der Pumpe dar, der seinerseits durch Phosphorylierung inaktiviert wird (Lehnart et al. 2004; Venetucci et al. 2008). Eine solche Phosphorylierung tritt auf, wenn unter β -Adrenozeptorstimulation (Sympathikus) die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird, und führt durch die beschleunigte Ca^{2+} Wiederaufnahme in das SR zu einer Verkürzung der Relaxationszeit (Guimaraes und Moura 2001; Frank et al., 2003; Venetucci et al. 2008; Mattiazzi und Kranias, 2014). Dieser Effekt konnte in Abschnitt 4.4.4 durch eine β -Adrenozeptorstimulation mit Isoprenalin

gezeigt werden. Eine Beeinflussung des β -adrenergen Signalweges durch überexprimierte hMR^{DEF}-Rezeptoren konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Auch Ouvrard-Pascaud et al. konnten bei den Mäusen, die eine verlängerte Repolarisation aufwiesen, keine Aldosteron induzierten Veränderungen des Ca²⁺-Recycling-Prozesses finden (Ouvrard-Pascaud 2005). Dennoch konnten andere Forschergruppen einen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Phospholamban-Expression und einer eingeschränkten ventrikulären Relaxation bei Mäusen zeigen. Eine SERCA-Überexpression dagegen führte bei transgenen Mäusen zu einer Verlängerung der Relaxationszeit (Zhang et al. 2008; Kranias und Hajjar 2012; Mattiazzi und Kranias 2014). Erste eigene Untersuchungen der Expression von Phospholamban und SERCA konnten keine eindeutigen Befunde liefern. Es sollten daher weitere Experimente erfolgen, z.B. auch die Bestimmung der SERCA-Aktivität und der Phosphorylierungszustand von Phospholamban.

5.4 Untersuchung der Herzfrequenz

Die Herzfrequenz basiert auf der spontanen Aktivität von Zellen des Sinusknotens. Dieser Sinusknoten enthält die für die Kontrolle der Herzfrequenz wichtigen unselektiven HCN (hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated)-Kanäle, welche unter Hyperpolarisation öffnen. Über diese Kanäle läuft während der Diastole der Schrittmacherstrom I_f, der zu einer kontinuierlichen Depolarisation der Zellen führt (DiFrancesco 2010). Demnach folgt oberhalb eines Schwellenwertes ein Aktionspotential, welches weitergeleitet wird und zu einer kontrollierten Myokardkontraktion führt (Stamm 2012). Es existieren mehrere Untereinheiten dieses Kanals, wobei HCN4 die dominierende Untereinheit in Schrittmacherzellen der Maus und des Menschen darstellt (Ludwig et al. 1999; Lei et al. 2004; Mommersteeg et al. 2007). Die Besonderheit dieses Kanals liegt darin, dass dessen Strom I_f direkt durch cAMP beeinflusst wird (Santoro und Tibbs 1999; Kaupp und Seifert 2001; Altomare et al. 2001; Stieber et al. 2005).

Eine β -adrenerge Stimulation führt zu Aktivierung der Adenylatzyklase und damit zu Generierung von cAMP, welches direkt an den HCN-Kanal bindet und die Herzfrequenz erhöht (Brown et al. 1979). Dieser Effekt konnte durch Isoprenalin in Abschnitt 4.5.1 bereits gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte Aldosteron im akuten Experiment weder bei Wildtyp- noch bei transgenen Mäusen einen vergleichbar schnell einsetzenden Effekt auf die Herzfrequenz. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die nicht-genomische Signaltransduktion von Aldosteron ohne Beeinflussung des cAMP-Spiegels abläuft. Dies

steht jedoch im Widerspruch zu Ergebnissen aus der Literatur, in der bereits eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in glatten Muskelzellen des Schweines (Christ et al. 1999) sowie in Sammelrohren der Niere von Ratten (Sheader et al. 2002) auf nicht-genomischem Wege beschrieben wurde. Eine Gewebe- und/ oder Spezies-abhängige cAMP-Induktion könnte diesen konträren Ergebnissen zugrunde liegen, zumal auch Wehling et al. im Rahmen einer klinischen Studie keine Veränderung der Herzfrequenz drei und zehn Minuten nach intravenöser Applikation von 1 mg Aldosteron feststellen konnten (Wehling et al. 1998).

5.5 Elektrokardiographische Untersuchungen (EKG)

5.5.1 Analyse der P-Welle

Elektrokardiographische Untersuchungen (EKG) zeigten bei transgenen Mäusen eine verlängerte P-Welle. Im menschlichen EKG liegt dieser Veränderung in der Regel eine Hypertrophie der Vorhöfe auf dem Boden einer erhöhten Vorhofbelastung zugrunde (Mann 2014). Eine erhöhte Herzmuskelmasse, die diese Vermutungen untermauern könnte, ließ sich in dieser Arbeit jedoch nicht finden (siehe Abschnitt 4.3).

Die Verlängerung der P-Welle könnte Ausdruck der verlängerten Repolarisation unter chronisch erhöhtem Aldosteron-Einfluss sein (Benitah et al. 2001; Ouvrard-Pascaud 2005) und würde damit in Übereinstimmung mit Ergebnissen der verlängerten Relaxationszeit transgener Vorhöfe aus dieser Arbeit stehen (Abschnitt 4.4.4 und 5.3). Dazu passt, dass sowohl die verlängerte P-Welle als auch die verlängerte Relaxation der Vorhöfe unter Basalbedingungen beobachtet wurden und damit beide Effekte über genomische Signalwege abzulaufen scheinen. Wie schon in Abschnitt 5.3 erläutert, könnte auch die verlängerte P-Welle (genomischer Effekt) Folge der erhöhten hMR^{DEF}-Expression sein, welche auf primär nicht-genomischem Wege die Genexpression beeinflusst hat (sekundär genomischer Effekt). Eine durch Aldosteron verringerte K⁺-Kanal-Expression führt zu einer verlängerten Erregungsrückbildung (Repolarisation) der Vorhöfe (Benitah et al. 2001; Ouvrard-Pascaud 2005; Hilal-Dandan et al. 2014), welche sich im EKG als verlängerte P-Welle darstellen kann (Mann 2014).

5.5.2 Analyse der R-Amplitude

Die vorliegende Arbeit konnte eine verringerte R-Amplitude transgener Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren zeigen.

Die Vergrößerung der R-Amplitude ist im menschlichen Elektrokardiogramm (EKG) ein relativ häufiges Phänomen und in der Regel Ausdruck einer Zunahme der Herzmuskelmasse und des Gewichtes, häufig ausgelöst durch eine erhöhte Herzbelastung (Mann 2014). Eine Beteiligung Aldosterons an dieser kardialen Hypertrophie (Duprez et al. 1993; Deedwania 1997; Delles et al. 2003; Indra et al. 2014) wurde bereits in der Einleitung angedeutet. Umgekehrt kann eine unter die Norm verkleinerte R-Amplitude eine Hypotrophie des Herzens anzeigen. Aber auch nach einem abgelaufenen Herzinfarkt kann häufig ein sogenannter R-Verlust nachgewiesen werden (Mann 2014).

Gegen eine veränderte R-Amplitude aufgrund einer abnormen Muskelmasse spricht jedoch die gravimetrische Auswertung, bei der kein Unterschied zwischen Wildtyp- und transgenen Mäusen gefunden werden konnte. Als Ursache müssen daher neben elektrophysiologischen Veränderungen (für die in der Literatur keine Hinweise gefunden werden konnten), durchaus auch Ableitungsartefakte in Betracht gezogen werden, zumal in dieser Arbeit keine standardisierte EKG-Ableitung über die Brustwand verwendet wurde. Die Größe der R-Zacke variiert daher von Ableitung zu Ableitung und hängt außerdem von der Lage der elektrischen Herzachse ab. Dennoch konnten durchaus vergleichbare Werte der R-Amplitude von Wildtyp-Mäusen dieser Arbeit und Mäusen gefunden werden, deren R-Amplitude ebenfalls nach Anbringung von 4 Extremitätenelektroden aufgezeichnet wurde (Goldbarg et al. 1968). Das Körpergewicht der Mäuse, welches mit dem Herzgewicht korreliert (Abschnitt 4.3) unterschied sich bei Goldbarg et al. nicht wesentlich von dem der Wildtyp-Mäuse der vorliegenden Arbeit.

Weder eine Aldosteron induzierte Hypertrophie (Duprez et al. 1993; Delles et al. 2003; Indra et al. 2014) noch abnorme Fibrosebildungen des Herzens (Brilla und Weber 1992; Brilla et al. 1993; Young et al. 1995; Robert et al. 1995; Blasi et al. 2003) konnten in dieser Arbeit gefunden werden. Diese Erkenntnis lässt die Vermutung zu, dass die alleinige Überexpression von hMR^{DEF} nicht ausreichend für die Induktion dieser pathologischen Prozesse ist. Andererseits konnten jedoch auch andere Arbeitsgruppen keine strukturellen Veränderungen des Herzens an hMR überexprimierenden Mäusen feststellen (Ouvrard-Pascaud 2005). Dies zeigt, dass auch weitere Faktoren Einfluss auf pathologische Umbauprozesse des Herzens haben. Hierzu gehören z.B. der Aldosteron- und Angiotensin-II-Plasmaspiegel (Mazak et al. 2004; Min et al. 2005), die Höhe des Blutdruckes (Deedwania 1997) sowie die Höhe der Kochsalzzufuhr (Brilla und Weber 1992; Schwerdt et al. 2012).

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hat sich der Untersuchung des dualen Wirkmechanismus von Aldosteron gewidmet. Es konnte ein transgenes Tiermodell etabliert werden, welches eine Unterscheidung von genomischen und nicht-genomischen Aldosteron-Effekten an Mausvorhöfen erlaubt. Hierzu wurde ein DNA-Konstrukt des humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR) generiert, das ausschließlich nicht-genomische Effekte zu vermitteln in der Lage ist (hMR^{DEF}). Die erfolgreiche Klonierung und Expression dieses Rezeptors konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Anhand von Organbadversuchen wurden Messungen der Kontraktionskraft sowie der Anspannungs- und Erschlaffungszeit linker Vorhöfe und Untersuchungen der Herzfrequenz spontan schlagender rechter Vorhöfe vorgenommen. Es zeigte sich sowohl bei transgenen Mäusen (TG) als auch bei Wildtyp-Mäusen (WT) eine durch Aldosteron induzierte und über nicht-genomische Signalwege vermittelte Abnahme der Kraft (negative Inotropie). Der nicht vorhandene Unterschied ($p > 0,05$) dieser Kraftabnahme zwischen WT und TG zeigt einen von der hMR^{DEF}-Überexpression unabhängigen Effekt und deutet auf einen MR-unabhängigen Signalweg hin. Möglich scheint eine Induktion durch einen noch weitgehend unbekanntes Membranrezeptor.

Unter Basalbedingungen konnten bei transgenen Tieren eine verlängerte Relaxationszeit linker Vorhöfe und im Rahmen von elektrokardiographischen Untersuchungen (EKG) eine Verlängerung der P-Welle gezeigt werden. Beide Effekte laufen auf genomischem Wege ab und scheinen durch die Überexpression des hMR^{DEF} auf primär nicht-genomischem Wege beeinflusst zu sein (sekundär genomischer Effekt). Einen möglichen Mechanismus für diese Beobachtungen stellt eine verringerte K⁺-Kanalexpression der Vorhöfe dar. Der dadurch verringerte Kaliumausstrom während der Plateauphase des Aktionspotentials kann zu einer verlängerten Erregungsrückbildung (Repolarisation) führen, welche sich im EKG als verlängerte P-Welle darstellt. Auch die Muskelrelaxation kann sich durch einen verringerten Kaliumstrom verlängern. Dieser Mechanismus muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Ein Aldosteron-Effekt auf die Herzfrequenz, welcher über nicht-genomische Signalwege vermittelt wird, konnte nicht gezeigt werden.

Ein in der Literatur beschriebener pathologischer Aldosteron-Einfluss, der zu kardialer Fibrose und Hypertrophie führt, konnte bei hMR^{DEF}-überexprimierenden Mäusen nicht gezeigt werden. Ob die alleinige hMR^{DEF}-Überexpression für die Induktion dieser pathologischen Prozesse nicht ausreichend ist, kann nicht abschließend geklärt werden, da in dieser Arbeit andere Faktoren wie Blutdruck, Aldosteron- und Angiotensin-II-Spiegel und

Kochsalzzufuhr, die auch Einfluss auf diese Umbauprozesse des Herzens haben, nicht näher untersucht werden konnten.

Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Arbeit Ergebnisse jüngerer Forschungen, die pathologische Aldosteron-Effekte des Herzens nicht nur auf genomischen, sondern auch auf nicht-genomischen Wegen zeigen konnten. Dessen ungeachtet bedürfen diese schnell ablaufenden Effekte weiterer Klärung hinsichtlich ihrer molekularen Mechanismen sowie ihrer physiologischen und klinischen Relevanz. Die Etablierung eines transgenen Tiermodells, welches die separate Untersuchung des nicht-genomischen Signalweges erlaubt, stellt ein nützliches Hilfsmittel für weitere Forschungen dar und kann möglicherweise auch in zukünftigen Versuchen Wissenslücken auf diesem Gebiet schließen.

7 Literaturverzeichnis

- Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A, DiFrancesco D (2001) Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels. *The Journal of general physiology* 117:519–32
- Alzamora R, Brown L R, Harvey B J (2007) Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by aldosterone and 17 β -estradiol. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 21:2637–50
- Anderson, P A W, Manring A, Johnson E A (1973) Force-Frequency Relationship: A Basis for a New Index of Cardiac Contractility? *Circulation Research* 33:665–71
- Armanini D, Strasser T, Weber P C (1985) Characterization of aldosterone binding sites in circulating human mononuclear leukocytes. *The American journal of physiology* 248:388–90
- Arriza J L, Weinberger C, Cerelli G, Glaser T M, Handelin B L, Housman D E, Evans R M (1987) Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science (New York, N.Y.)* 237:268–75
- Barbato J C, Mulrow P J, Shapiro J I, Franco-Saenz R (2002) Rapid Effects of Aldosterone and Spironolactone in the Isolated Working Rat Heart. *Hypertension* 40:130–35
- Beggah A T, Escoubet B, Puttini S, Cailmail S, Delage V, Ouvrard-Pascaud A, Bocchi B, et al. (2002) Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7160–65
- Benitah J P, Perrier E, Gomez A M, Vassort G (2001) Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology* 537:151–60
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole T J, Peters J, Watanabe H, Kriz W, et al. (1998) Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9424–29
- Berul C I, Aronovitz M J, Wang P J, Mendelsohn M E (1996) In Vivo Cardiac Electrophysiology Studies in the Mouse. *Circulation* 94:2641–48
- Blasi E R, Rocha R, Rudolph A E, Blomme, Eric A G, Polly M L, McMahon E G (2003) Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney international* 63:1791–800
- Bonvalet J P (1998) Regulation of sodium transport by steroid hormones. *Kidney international. Supplement* 65:49–56
- Brilla C G, Matsubara L S, Weber K T (1993) Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *Journal of molecular and cellular cardiology* 25:563–75
- Brilla C G, Weber K T (1992) Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 120:893–901
- Brown H F, DiFrancesco D, Noble S J (1979) How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280:235–36
- Bujard H (1999) Controlling genes with tetracyclines. *The journal of gene medicine* 1:372–74
- Burge J A, Hanna M G, Schorge S (2013) Nongenomic actions of progesterone and 17 β -estradiol on the chloride conductance of skeletal muscle. *Muscle & nerve* 48:589–91

- Cato, Andrew C B, Nestl A, Mink S (2002) Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2002:9
- Chai W, Garrelds I M, Vries R de, Batenburg W W, van Kats, Jorge P, Danser, A H Jan (2005) Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II. *Hypertension* 46:701–06
- Christ M, Gunther A, Heck M, Schmidt B M, Falkenstein E, Wehling M (1999) Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 99:1485–91
- Christ M, Haseroth K, Falkenstein E, Wehling M (1999) Nongenomic steroid actions: fact or fantasy? *Vitamins and hormones* 57:325–73
- Christ M, Sippel K, Eisen C, Wehling M (1994) Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidneys. *Molecular and cellular endocrinology* 99:31-4
- Chrysostomou A, Becker G (2001) Spironolactone in addition to ACE inhibition to reduce proteinuria in patients with chronic renal disease. *The New England journal of medicine* 345:925–26
- Deedwania P C (1997) The progression from hypertension to heart failure. *American journal of hypertension* 10:280-288
- Delles C, Schmidt, Bernhard M W, Muller H J, Oehmer S, Klingbeil A U, Schmieder R E (2003) Functional relevance of aldosterone for the determination of left ventricular mass. *The American journal of cardiology* 91:297–301
- DiFrancesco D (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circulation research* 106:434–46
- Duprez D A, Bauwens F R, De Buyzere, M L, De Backer, T L, Kaufman J M, van Hoecke J, Vermeulen A, et al. (1993) Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *The American journal of cardiology* 71:17-20
- Farman N (1999) Molecular and cellular determinants of mineralocorticoid selectivity. *Current opinion in nephrology and hypertension* 8:45–51
- Fozzard H A, Sheets M F (1985) Cellular mechanism of action of cardiac glycosides. *Journal of the American College of Cardiology* 5:10-15.
- Francois H, Placier S, Flamant M, Tharaux P-L, Chansel D, Dussaule J-C, Chatziantoniou C (2004) Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:926–28
- Gergs U, Baumann M, Böckler A, Buchwalow I B, Ebel H, Fabritz L, Hauptmann S, et al. (2010) Cardiac overexpression of the human 5-HT₄ receptor in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299:788-98
- Goldberg A N, Hellerstein H K, Bruell J H, Daroczy A F (1968) *Electrocardiogram of the Normal Mouse Mus Musculus: General Considerations and Genetic Aspects*
- Good D W, George T, Watts B A (2002) Aldosterone inhibits HCO absorption via a nongenomic pathway in medullary thick ascending limb. *American journal of physiology. Renal physiology* 283:699–706
- Grossmann C, Benesic A, Krug A W, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B, Gekle M (2005) Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19:1697–710
- Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Husse B, Gekle M (2008) EF domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions. *The Journal of biological chemistry* 283:7109–16

- Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Krug A W, Gekle M (2004) Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na⁺ reabsorption. *American journal of physiology. Renal physiology* 286:1226-31
- Grossmann C, 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 (2010) Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803:584–90
- Grossmann C, Krug A W, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M (2007) Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 292:1790-800
- Guimaraes S, Moura D (2001) Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological reviews* 53:319–56
- Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, Robbins J (1991) Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *The Journal of biological chemistry* 266:9180–85
- Hall J E, Guyton A C, Brands M W (1996) Pressure-volume regulation in hypertension. *Kidney international. Supplement* 55:35–41
- Han K H, Kang Y S, Han S-Y, Jee Y H, Lee M H, Han J Y, Kim H K, et al. (2006) Spironolactone ameliorates renal injury and connective tissue growth factor expression in type II diabetic rats. *Kidney international* 70:111–20
- Haseroth K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Günther A, Herbst C, Christ M, et al. (1999) Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications* 266:257–61
- Hilal-Dandan R, Brunton L L, Goodman L S (2014) Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics, editors Randa Hilal-Dandan, Laurence L. Brunton. McGraw-Hill, New York
- Ho K J, Liao J K (2002) Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Molecular interventions* 2:219–28
- Indra T, Holaj R, Strauch B, Rosa J, Petrak O, Somloova Z, Widimsky J, JR (2014) Long-term effects of adrenalectomy or spironolactone on blood pressure control and regression of left ventricle hypertrophy in patients with primary aldosteronism. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*
- Jorde U P (2002) Elevated Plasma Aldosterone Levels Despite Complete Inhibition of the Vascular Angiotensin-Converting Enzyme in Chronic Heart Failure. *Circulation* 106:1055–57
- Kagiyama S, Eguchi S, Frank G D, Inagami T, Zhang Y C, Phillips M I (2002) Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation* 106:909–12
- Kaupp U B, Seifert R (2001) Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annual review of physiology* 63:235–57
- Knollmann B C, Schober T, Petersen A O, Sirenko S G, Franz M R (2007) Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292:H614-21
- Kranias E G, Hajjar R J (2012) Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulome. *Circulation Research* 110:1646–60

- Krug A W, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildenerger S, Govindan M V, Gekle M (2003) Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *The Journal of biological chemistry* 278:43060–66
- Lalevee N, Rebsamen M C, Barrere-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Benitah J-P, Rossier M F (2005) Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research* 67:216–24
- Lang S M, Schiffli H (2013) Drugs affecting the renin-angiotensin system and preservation of residual renal function in dialysis patients. *Therapeutic apheresis and dialysis : official peer-reviewed journal of the International Society for Apheresis, the Japanese Society for Apheresis, the Japanese Society for Dialysis Therapy* 17:242–43
- Le Moellic C, Ouvrard-Pascaud A, Capurro C, Cluzeaud F, Fay M, Jaisser F, Farman N, et al. (2004) Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 15:1145–60
- Lehnart S E, Wehrens, Xander H T, Kushnir A, Marks A R (2004) Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1015:144–59
- Lei M, Jones S A, Liu J, Lancaster M K, Fung S S-M, Dobrzynski H, Camelliti P, et al. (2004) Requirement of neuronal- and cardiac-type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking. *The Journal of physiology* 559:835–48
- Losel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:46–56
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999) Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *The EMBO journal* 18:2323–29
- Maggiolini M, Picard D (2010) The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *The Journal of endocrinology* 204:105–14
- Mann D L (2014) Braunwald's heart disease. A textbook of cardiovascular medicine, 2-volume set. Saunders (W B) Co Ltd
- Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, Nishikawa S, et al. (2004) Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation* 110:317–23
- Matsui S, Satoh H, Kawashima H, Nagasaka S, Niu C F, Urushida T, Katoh H, et al. (2007) Non-genomic effects of aldosterone on intracellular ion regulation and cell volume in rat ventricular myocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 85:264–73
- Mattiazzi A, Kranias E G (2014) The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Frontiers in pharmacology* 5:5
- Mazak I, Fiebeler A, Muller D N, Park J-K, Shagdashuren E, Lindschau C, Dechend R, et al. (2004) Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 109:2792–800
- Meinel S, Gekle M, Grossmann C (2014) Mineralocorticoid receptor signaling: Crosstalk with membrane receptors and other modulators. *Steroids*
- Mihailidou A S, Mardini M, Funder J W (2004) Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C. *Endocrinology* 145:773–80
- Min L-J, Mogi M, Li J-M, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M (2005) Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 97:434–42

- Mommersteeg, Mathilda T M, Hoogaars, Willem M H, Prall, Owen W J, de Gier-de Vries, Corrie, Wiese C, Clout, Danielle E W, Papaioannou V E, et al. (2007) Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circulation research* 100:354–62
- Morrison N, Harrap S B, Arriza J L, Boyd E, Connor J M (1990) Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Human genetics* 85:130–32
- Moura A M, Worcel M (1984) Direct action of aldosterone on transmembrane 22Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension* 6:425–30
- Muller D N, Luft F C (1998) The renin-angiotensin system in the vessel wall. *Basic research in cardiology* 93 Suppl 2:7–14
- Müller L (2004) Elektrophysiologische und echokardiographische Phänotypisierung A1 und A3 Adenosinrezeptor überexprimierender Mäuse. Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, 2004
- Nagata D, Takahashi M, Sawai K, Tagami T, Usui T, Shimatsu A, Hirata Y, et al. (2006) Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity. *Hypertension* 48:165–71
- Namsolleck P, Unger T (2014) Aldosterone synthase inhibitors in cardiovascular and renal diseases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 29 Suppl 1:62-68
- Ng W A, Grupp I L, Subramaniam A, Robbins J (1991a) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. *Circulation research* 68:1742–50
- Nuclear Receptor Nomenclature Committee (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97:161–63
- Orshal J M, Khalil R A (2004) Gender, sex hormones, and vascular tone. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 286:233-49
- Ouvrard-Pascaud A (2005) Conditional Mineralocorticoid Receptor Expression in the Heart Leads to Life-Threatening Arrhythmias. *Circulation* 111:3025–33
- Ouvrard-Pascaud A, Jaisser F (2003) Pathophysiological role of the mineralocorticoid receptor in heart: analysis of conditional transgenic models. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 445:477–81
- Pappas T C, Gametchu B, Watson C S (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9:404–10
- Pascual-Le Tallec L, Lombès M (2005) The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 19:2211–21
- Pearce D, Bhargava A, Cole T J (2003) Aldosterone: its receptor, target genes, and actions. *Vitamins and hormones* 66:29–76
- Phelan D, Thavendiranathan P, Collier P, Marwick T H (2012) Aldosterone antagonists improve ejection fraction and functional capacity independently of functional class: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart (British Cardiac Society)* 98:1693–700
- Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, et al. (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 348:1309–21
- Pitt B, Zannad F, Remme W J, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, et al. (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure.

- Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The New England journal of medicine 341:709–17
- Puttini S, Beggah A T, Ouvrard-Pascaud A, Legris C, Blot-Chabaud M, Farman N, Jaisser F (2001) Tetracycline-inducible gene expression in cultured rat renal CD cells and in intact CD from transgenic mice. American journal of physiology. Renal physiology 281:1164-72
- Ren Y, D'Ambrosio M A, Garvin J L, Leung P, Kutskill K, Wang H, Peterson E L, et al. (2014) Aldosterone sensitizes connecting tubule glomerular feedback via the aldosterone receptor GPR30. American journal of physiology. Renal physiology 307:427-34
- Rickard A J, Morgan J, Tesch G, Funder J W, Fuller P J, Young M J (2009) Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. Hypertension 54:537–43
- Robert V, Silvestre J S, Charlemagne D, Sabri A, Trouve P, Wassef M, Swynghedauw B, et al. (1995) Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. Hypertension 26:971–78
- Rocha R, Rudolph A E, Frierdich G E, Nachowiak D A, Kekec B K, Blomme, Eric A G, McMahon E G, et al. (2002) Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 283:1802-10
- Rousseau M F, Konstam M A, Benedict C R, Donckier J, Galanti L, Melin J, Kinan D, et al. (1994) Progression of left ventricular dysfunction secondary to coronary artery disease, sustained neurohormonal activation and effects of ibopamine therapy during long-term therapy with angiotensin-converting enzyme inhibitor. The American journal of cardiology 73:488–93
- Rude M K, Duhaney T-A S, Kuster G M, Judge S, Heo J, Colucci W S, Siwik D A, et al. (2005) Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. Hypertension 46:555–61
- Saenger, Orth, Kisker, Hillen, Hinrichs (2000) The Tetracycline Repressor-A Paradigm for a Biological Switch. Angewandte Chemie (International ed. in English) 39:2042–52
- Sambrook, Russel (2000) Molecular Cloning: A laboratory manual
- Santoro B, Tibbs G R (1999) The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. Annals of the New York Academy of Sciences 868:741–64
- Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T (2003) Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. Hypertension 41:64–68
- Schneider S W, Yano Y, Sumpio B E, Jena B P, Geibel J P, Gekle M, Oberleithner H (1997) Rapid aldosterone-induced cell volume increase of endothelial cells measured by the atomic force microscope. Cell biology international 21:759–68
- Schwerdt G, Frisch A, Mildenerger S, Hilgenfeld T, Grossmann C, Gekle M (2012) Influence of aldosterone and salt or ouabain in a10 rat aorta smooth muscle cells. Journal of vascular research 49:231–41
- Shader E A, Wargent E T, Ashton N, Balment R J (2002) Rapid stimulation of cyclic AMP production by aldosterone in rat inner medullary collecting ducts. The Journal of endocrinology 175:343–47
- Sinphitukkul K, Eiam-Ong S, Manotham K, Eiam-Ong S (2011) Nongenomic effects of aldosterone on renal protein expressions of pEGFR and pERK1/2 in rat kidney. American journal of nephrology 33:111–20

- Staessen J, Lijnen P, Fagard R, Verschueren L J, Amery A (1981) Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression. *The Journal of endocrinology* 91:457–65
- Stamm C M (2012) Vaskuläre Effekte einer gezielten Herzfrequenzreduktion mittels I(f)-Kanalinhibition im Modell der ApoE-defizienten Maus und in Wildtyp-Mäusen
- Stieber J, Stockl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F (2005) Functional expression of the human HCN3 channel. *The Journal of biological chemistry* 280:34635–43
- Stockand J D (2002) New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *American journal of physiology. Renal physiology* 282:F559-76
- Tanz R D (1963) Inotropic effects of certain steroids upon heart muscle. *Revue canadienne de biologie / editee par l'Universite de Montreal* 22:147–63
- Tsien R Y (1998) The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67:509–44
- Turchin A, Guo C Z, Adler G K, Ricchiuti V, Kohane I S, Williams G H (2006) Effect of acute aldosterone administration on gene expression profile in the heart. *Endocrinology* 147:3183–89
- Usher M G, Duan S Z, Ivaschenko C Y, Frieler R A, Berger S, Schutz G, Lumeng C N, et al. (2010) Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *The Journal of clinical investigation* 120:3350–64
- Venetucci L A, Trafford A W, O'Neill S C, Eisner D A (2008) The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovascular research* 77:285–92.
- Vila-Petroff MG, Martín G, Palomeque J, Mattiazzi A R (2003) Na(+)-Ca²⁺ exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium. *The Journal of physiology* 550:801–17
- Wang G-L, Wang G-X, Yamamoto S, Ye L, Baxter H, Hume J R, Duan D (2005) Molecular mechanisms of regulation of fast-inactivating voltage-dependent transient outward K⁺ current in mouse heart by cell volume changes. *The Journal of physiology* 568:423–43.
- Wehling M (1995) Aldosterone specific membrane receptors, rapid activation of the sodium-hydrogen exchanger, and cardiovascular implications. *Cardiovascular research* 29:167–71
- Wehling M, Eisen C, Christ M (1992) Aldosterone-specific membrane receptors and rapid non-genomic actions of mineralocorticoids. *Molecular and cellular endocrinology* 90:C5-9
- Wehling M, Spes C H, Win N, Janson C P, Schmidt B M, Theisen K, Christ M (1998) Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83:3517–22
- Young M, Head G, Funder J (1995) Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *The American journal of physiology* 269:657-62
- Zain M, Awan F R (2014) Renin Angiotensin Aldosterone System (RAAS): its biology and drug targets for treating diabetic nephropathy. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 27:1379–91
- Zennaro M C, Keightley M C, Kotelevtsev Y, Conway G S, Soubrier F, Fuller P J (1995) Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *The Journal of biological chemistry* 270:21016–20
- Zhang Y H, Zhang M H, Sears C E, Emanuel K, Redwood C, El-Armouche A, Kranias E G, et al. (2008) Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. *Circulation research* 102:242–49

- Zhu Y, Rice C D, Pang Y, Pace M, Thomas P (2003) Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2231–36
- Ziera T, Irlbacher H, Fromm A, Latouche C, Krug S M, Fromm M, Jaisser F, et al. (2009) Cnksr3 is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:3936–46

8 Anhang

8.1 Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, wurde das für Puffer und Lösungen verwendete Wasser als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage gewonnen.

8.1.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Proteinase K-Lösung	Proteinase K	10 mg/ml
TE/SDS-Puffer	Tris HCl	50 mM
	EDTA	100 mM
	SDS	0,5 %
	pH 8,0 autoklaviert	
TE-Puffer	Tris HCl	10 mM
	EDTA	0,25 mM
	autoklaviert	
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat pH 6,0	3 M
DEPC-Wasser	DEPC	0,1 % (V/V)
dNTP-Mix		
Agarosegel	Agarose	1 %
	TAE-Puffer	
	Ethidiumbromid	0,01 %
TAE-Puffer	Tris Base	1,99 M
	Eisessig	0,99 M
	EDTA	59,5 mM
Ladepuffer	TAE-Puffer	50 %
	Glycerol	50 %
	Bromphenolblau	

8.1.2 Kontraktionskraft- und Frequenzmessungen an Mäusevorhöfen

Tyrode

Stamm I	NaCl	17,5 % (g/V)
	KCl	1,005 % (g/V)
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,56 % (g/V)
Stamm II	NaHCO ₃	5,00 % (g/V)
Stamm III	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,29 % (g/V)
NaCl		119,8 mM
KCl		5,4 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O		1,1 mM
NaHCO ₃		22,6 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O		0,42 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O		1,8 mM
Glucose		5,05 mM
Ascorbinsäure		0,28 mM
Na ₂ -EDTA		0,05 mM
pH 7,4		

8.2 Verwendete Substanzen

Agarose, Typ SeaKem	FMC bioproducts, USA
Aldosteron	Sigma-Aldrich, Deutschland
L (+) – Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dibutyryl-cAMP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNA-Leiter GeneRuler	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
dNTP	MBI Fermentas, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Deutschland
Flumazenil	Fresenius Kabi, Deutschland
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Heparin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isoprenalin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumcanrenoat	Sigma-Aldrich, Deutschland
KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin	Sigma-Aldrich, Deutschland
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ -EDTA	C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pentobarbital	Spofa, Prag, Tschechien
Phenol	C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
10 x PCR-Puffer, 15 mM MgCl ₂	Ampliqon, Odense, Dänemark
Taq-DNA-Polymerase	Ampliqon, Odense, Dänemark
HCl	C. Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka AG, Buch, Deutschland

8.3 Geräte und Bezugsquellen

PCR-Gerät Mastercycler gradient; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge Modell 5415 C; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland

Biophotometer; Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland

Elektrophoresekammer Typ Horizon 58; Life Technologies, Gaithersburg, USA

Waage Typ AT261 DeltaRange; Mettler Instruments GmbH, Gießen, Deutschland

pH-Meter; WTW GmbH, STH 600, Weilheim, Deutschland

Kontraktionskraftmessanlage (Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland)

- Verstärker und integrierter Schreiber (Graphtec, Linearcorder mark, VII, WR 3101)
- Reizgerät mit 4 Kanälen (ELV Takt- und Impulsgenerator TIG 7000)
- Wärmebad (CS Lauda)
- 4 Transducer (Kent, Scientific corporation, Isometric Transducer)
- 4 Doppelwandgefäße, 4 Stative, 4 Elektroden, Halterungsstäbe, Haken
- Software: IOX (emka TECHNOLOGIES, Paris, Frankreich)

Software: Prism 5 (GraphPad, San Diego, Kalifornien, USA)

8.4 Primer

Forward Primer MHC-SEQ-P1, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
5'-ACC CTT ACC CCA CAT AGA CC-3'

Reverse Primer hMR-E-Seg-rev II, biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
5'-ATT GCG GGG AAC TCT ACC TT-3'

8.5 PCR-Programm

Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	30 s	29 Zyklen
Annealing	60 °C	30 s	
Extension	72 °C	2 min	
Finale Extension	72 °C	6 min	1 Zyklus

9 Thesen

1. Es wurde ein transgenes Tiermodell der Maus mit Überexpression des verkürzten humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR^{DEF}) generiert.
2. Die erfolgreiche Klonierung des hMR^{DEF}-Rezeptors wurde mittels PCR in den transgenen Tieren nachgewiesen.
3. Die erfolgreiche Expression des hMR^{DEF}-Rezeptors wurde mittels immunhistologischer Untersuchungen in den transgenen Tieren nachgewiesen.
4. Kardiale Veränderungen, wie Fibrose und Hypertrophie, welche im Zusammenhang mit erhöhten Aldosteron-Plasma-Spiegeln stehen, konnten nicht gezeigt werden.
5. Aldosteron wirkt negativ inotrop an linken Vorhöfen von Wildtyp- und transgenen Mäusen.
6. Die Kraftabnahme linker Vorhöfe wird über einen nicht-genomischen Signalweg vermittelt.
7. Die Kraftabnahme linker Vorhöfe erfolgt über einen vom „klassischen“ hMR unabhängigen Signalweg, möglicherweise induziert durch einen Membranrezeptor.
8. Aldosteron hat keinen nicht-genomischen Effekt auf die Herzfrequenz rechter Vorhöfe.
9. Aldosteron verlängert die Relaxationszeit von Vorhöfen hMR^{DEF} überexprimierender Mäuse.
10. Die verlängerte Relaxationszeit transgener Vorhöfe erfolgt auf sekundär-genomischem Wege.
11. Transgene Mäuse zeigen im EKG eine verlängerte P-Welle sowie eine verringerte R-Amplitude.

Persönliche Daten

Name Giso Joachim Schulitz
Geburtsdatum 01.05.1983
Geburtsort Hamburg

Beruflicher Werdegang

Seit 03.2015 Assistenzarzt für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Marienkrankenhaus Hamburg

Studium

12.2013 Approbation als Arzt
10.2009 – 10.2013 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität, Halle (Saale)
10.2013 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.2007 – 06.2009 Studium der Humanmedizin, Universität Pécs, Ungarn
06.2009 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05.2008 Auszeichnung „Jahrgangsbiologe“ im Bereich der molekularen Zellbiologie

Praktisches Jahr

03.2013 – 07.2013 Klinik für Innere Medizin, Abteilung für Kardiologie, Universitätsklinikum, Halle (Saale)
12.2012 – 03.2013 Zentrale Notaufnahme, Universitätsklinikum, Halle (Saale)
Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Halle (Saale)
08.2012 – 11.2012 Klinik für Gefäßchirurgie, St. Elisabeth-Krankenhaus, Halle (Saale)
Klinik für Viszeralchirurgie, St. Elisabeth-Krankenhaus, Halle (Saale)

Berufsausbildung

09.2005 – 02.2007 Biomedizinischer Assistent, Rheinisches Bildungszentrum e.V., Köln
Zusatzqualifikation „Molekularbiologie und Molekulare Medizin“

Weitere Tätigkeiten

08.2006 – 02. 2007 Mitarbeit in der Mikrobiologie der Labordiagnostischen Praxis Dr. med. Christiane Boogen, Köln
02. 2005 – 06. 2005 Sprachkurs an der Universität Salamanca, Spanien

Zivildienst

11. 2003 – 08. 2004 Kinder- u. Jugendheim Wakenitzhof, Vorwerker Diakonie, Lübeck

Schulische Bildung

2003 Abitur
1994 – 2003 Gymnasium Lerchenfeld, Hamburg
1990 – 1994 Grundschule Humboldtstraße, Hamburg

Hamburg, den 15. Januar 2015

Hiermit erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Charakterisierung eines transgenen Tiermodells mit herzspezifischer
Überexpression einer Variante des humanen Mineralokortikoid-Rezeptors (hMR^{DEF})
in der Maus**

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. J. Neumann)

selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

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

Hamburg, den 15.01.2015

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, Giso Joachim Schultiz, keine weiteren Promotionsversuche, weder im Inland noch im Ausland, unternommen zu haben. Die vorliegende Dissertation wird erstmalig eingereicht, es wurde kein anderer Antrag an einer anderen Universität oder Hochschule gestellt.

Hamburg, den 15.01.2015

Herrn Prof. Dr. med. Joachim Neumann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, sowie für seine umfassende wissenschaftliche Anleitung.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für die ausführlichen und produktiven Gespräche. Er stand mir jederzeit geduldig mit Rat und Tat zur Seite.

Mein Dank gilt ebenfalls den medizinisch technischen Mitarbeitern des Institutes. Frau Sonja Reber danke ich für die Einarbeitung in die praktischen Tätigkeiten meiner Arbeit, insbesondere für die Anleitung der Präparation der Mäuseherzen. Die gute Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft, für die ich mich auf bei Frau Pia Willmy bedanken möchte, ließen mich über den einen oder anderen Rückschlag auf meinem Weg hinwegsehen.

Ich danke meiner Freundin, die mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat.

Ganz besonders danken muss ich meiner Mutter, die mich nicht nur in finanzieller Hinsicht unterstützt hat, sondern mir auch auf meinem Weg das Studium der Medizin zu beginnen stets zur Seite stand.