

Aus dem Julius-Bernstein-Institut für Physiologie  
der medizinischen Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor Prof. Dr. Michael Gekle)

**Einfluss von Natriumchlorid sowie der Osmolalität auf die transkriptionelle Aktivität  
des Mineralokortikoidrezeptors und des Glukokortikoidrezeptors.**

**Dissertation**

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

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

von Tim Hilgenfeld  
geboren am 15.07.1986 in Beeskow

Gutachter:

1. Prof. Dr. Michael Gekle
2. Prof. Dr. Andreas Simm
3. Prof. Dr. Paul Dietl

01.12.2015

23.06.2016

## Referat

Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) spielt eine elementare Rolle bei der Natriumchlorid- (NaCl) und Wasserhomöostase sowie bei pathophysiologischen Gewebeveränderungen, wie renokardiovaskulärer Inflammation, Fibrose und Remodeling. Ein diesbezüglich relevanter Faktor ist vermutlich NaCl, da sowohl lokal als auch systemisch erhöhte NaCl-Konzentrationen bei schädigender MR-Aktivität nachgewiesen wurden und vice versa die Endorganschäden nicht unter einer NaCl-armen Diät auftraten. Bisher ist unklar auf welchem Weg die pathologisch gesteigerte MR-Aktivierung in einem proinflammatorischen Milieu ohne erhöhte Aldosteronkonzentrationen erfolgt. Postuliert werden eine Steigerung der Aldosteronaffinität des MR und/oder eine Aktivierung des MR durch Glukokortikoide, welche im physiologischen Milieu eine antagonistische Wirkung am MR besitzen. Zur Untersuchung dieses Zusammenhanges zwischen Aldosteron- und Glukokortikoid-induzierter MR-Aktivität unter NaCl-Einfluss wurde unter kontrollierten Bedingungen und unter Ausschluss weiterer Regulationssysteme die genomische MR-Aktivität mit einem Reporterkonstrukt in einem heterologen Expressionssystem untersucht. Als Vergleichsrezeptor diente der nächste Verwandte des MR der Glukokortikoidrezeptor (GR), welcher unter anderem antiinflammatorische Effekte vermittelt. Ferner wurde Mannit eingesetzt um zwischen NaCl-spezifischen und Osmolalitäts-abhängigen Effekten unterscheiden zu können.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die genomische Aldosteron-induzierte MR-Aktivität durch extrazelluläres NaCl und nicht durch die damit verbundene veränderte Osmolalität stimuliert wird. Daher könnte NaCl eine entscheidende Initiationsfunktion bei der Entwicklung von MR-abhängigen renokardiovaskulären Schäden zukommen. Im Gegensatz dazu konnte die genomische GR-Aktivität durch Veränderungen der extrazellulären Osmolalität gesteigert werden, was sehr gut zur bekannten Regulation des Zellvolumens durch den GR passt. Darüber hinaus konnte eine osmolalitätsunabhängige, NaCl-spezifische Aktivitätssteigerung des GR gezeigt werden. Dies ist von besonderem Interesse, da kürzlich ein GR-Beitrag zur NaCl-abhängigen Hypertonie nachgewiesen wurde.

Hilgenfeld, Tim: Einfluss von Natriumchlorid sowie der Osmolalität auf die transkriptionelle Aktivität des Mineralokortikoidrezeptors und des Glukokortikoidrezeptors  
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Vorwort .....	1
1.2	Mineralokortikoidrezeptor.....	1
1.3	Glukokortikoidrezeptor - Ein kurzer Vergleich .....	3
1.4	Aldosteron, MR und deren Wirkungen .....	4
1.4.1	Klassische Aldosteron-MR Wirkungen .....	4
1.4.2	Nichtklassische Aldosteron-MR-Wirkungen I - Hypertonie und Interaktionen mit Ouabain .....	8
1.4.3	Nichtklassische Aldosteron-MR-Wirkungen II - Induktion eines proinflammatorischen Milieus und des Remodeling .....	13
1.5	Regulation der MR-Aktivität .....	16
1.6	Rolle des NaCl in der pathophysiologischen MR-Aktivität .....	17
1.7	Zielstellungen .....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1	Material.....	19
2.1.1	Chemikalien.....	19
2.1.2	Geräte .....	20
2.1.3	Verwendete Programme .....	21
2.2	Zellkultur.....	21
2.2.1	Zelllinien und deren Kultivierung/ Passagierung .....	21
2.2.2	Einfrieren/ Auftauen von Zelllinien .....	21
2.2.3	Transiente Transfektion .....	22
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	22
2.3.1	RNA-Isolation und Reverse Transkription .....	22
2.3.2	Polymerasekettenreaktion und Primeretablierung.....	22
2.3.3	Quantitative real time PCR .....	23
2.3.4	DNA-Gelelektrophorese.....	24
2.3.5	Plasmidgewinnung.....	24
2.4	Funktionelle Analysen/ Assays .....	24
2.4.1	GRE-Reporter-Gen-Assay und $\beta$ -Galaktosidase-Assay .....	24
2.4.2	Intrazelluläre $Ca^{2+}$ - und $Na^{+}$ -Konzentrationsmessungen .....	25

---

2.5	Fluoreszenzmikroskopie .....	27
2.5.1	Immunfluoreszenz .....	27
2.5.2	In vivo Imaging .....	27
2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	27
2.6.1	Proteinlysatherstellung .....	27
2.6.2	Proteinquantifizierung .....	28
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	28
2.7	Statistik und Datenverarbeitung .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Modulation der MR-/ GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit in HEK-293 .....	30
3.1.1	MR-/ GR-Aktivierung.....	30
3.1.2	Modulation der Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten MR-Aktivität durch NaCl/ Mannit.....	33
3.1.3	Modulation der Hydrokortison-induzierten GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit..	37
3.1.4	MR-GR-Interaktion.....	38
3.1.5	Modulation der SGK-1-Expression.....	39
3.2	Modulation der MR-/ GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit in A10 Zellen.....	40
3.2.1	MR-/ GR-Aktivierung.....	41
3.2.2	Modulation der Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten MR-Aktivität durch NaCl/ Mannit.....	44
3.2.3	Modulation der Hydrokortison-induzierten GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit..	46
3.3	Interaktionen von Ouabain und MR/ GR .....	47
3.3.1	Modulation der MR-Aktivität durch Ouabain $\pm$ NaCl in HEK-293 und A10 Zellen.....	47
3.3.2	Ouabaineinfluss auf die Ca <sup>2+</sup> -Homöostase in HEK-293 .....	51
3.3.3	Intrazelluläre Na <sup>+</sup> -Konzentrationsmodulation durch Ouabain in HEK-293 .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>55</b>
4.1	Modulation der MR-/ GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit .....	55
4.1.1	Mineralokortikoidrezeptor.....	56
4.1.2	Glukokortikoidrezeptor .....	59
4.1.3	Ergebnisbewertung des A10 Zellsystem .....	61
4.2	Interaktionen von Ouabain und MR/ GR .....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Thesen.....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Temperatur in Grad Celsius
11β-HSD II	11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ II
6PGD	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
a.e.	am ehesten
AF-1a /-b /-2	<i>activation function 1a /-b /-2</i>
Aldo	Aldosteron
Ang II	Angiotensin II
AP1	<i>activator protein 1</i>
APS	Ammonium-Peroxodisulfat
AS	Aminosäuren
AT <sub>1</sub> R	Angiotensin-1 Rezeptor
ATP1A1	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase mit α <sub>1</sub> Untereinheit
ATP1A2	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase mit α <sub>2</sub> Untereinheit
ATP1A3	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase mit α <sub>3</sub> Untereinheit
ATP1A4	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase mit α <sub>4</sub> Untereinheit
bp	Basenpaare
BSA	<i>albumin bovine fraction V</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium Ion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementärer DNA-Strang
CHIF	<i>channel inducing factor</i>
cMyc	<i>cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>

---

<b>CNKSR3</b>	<i>connector enhancer of kinase suppressor of ras 3</i>
<b>CRE</b>	<i>cAMP response element</i>
<b>CREB</b>	<i>cAMP response element binding protein</i>
<b>CREM</b>	<i>cAMP response element modulator</i>
<b>c-src kinase</b>	<i>cellular and sarcoma kinase</i>
<b>CyP-40</b>	Zyklophilin-40
<b>Dabco</b>	1,4-Diazobicyclo-2,2,2-octan
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DBD</b>	DNA-bindende Domäne
<b>DOCA</b>	Deoxykortikosteron-acetat
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E1</b>	Endothelin 1
<b>EC<sub>50</sub></b>	halbmaximale effektive Konzentration
<b>ED1</b>	CD68; Zellmarker für aktivierte Monozyten, Makrophagen und Mikroglia in Ratten
<b>EDHF</b>	<i>epithelium derived hyperpolarizing factor</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>EGFR</b>	<i>epithelial growth factor receptor</i>
<b>EGTA</b>	<i>ethylene glycol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
<b>ENaC</b>	Amilorid sensitiver epithelialer Natriumkanal
<b>ER</b>	endoplasmatisches Retikulum
<b>ERK 1/-2</b>	<i>extracellular-signal regulated kinase 1 und -2</i>
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>FKBP</b>	<i>FK506 binding protein</i>
<b>FURA-2 AM</b>	Fura-2-acetooxymethylester
<b>g</b>	Erdanziehungskraft
<b>G6PD</b>	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
<b>GILZ</b>	<i>glucocorticoid-induced leucine zipper</i>

---

---

<b>GPR30</b>	<i>G protein-coupled receptor 30</i>
<b>GR</b>	Glukokortikoidrezeptor
<b>GRE</b>	<i>glucocorticoid response element</i>
<b>GSA</b>	GRE-SEAP-Aktivität
<b>h</b>	Stunde(n)
<b>HEK-293</b>	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>
<b>HEPES</b>	Hepes Ringer
<b>hGR</b>	humaner Glukokortikoidrezeptor
<b>HIF-1</b>	<i>hypoxia-inducible factor-1</i>
<b>hMR</b>	humaner Mineralokortikoidrezeptor
<b>HRE</b>	<i>hormone response element</i>
<b>HSP</b>	<i>heat shock protein</i>
<b>Hydrok.</b>	Hydrokortison
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>K</b>	Kontrolle
<b>K<sub>d</sub></b>	Dissoziationskonstante
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>K-ras2</b>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>KS-WNK1</b>	<i>kidney specific WNK lysine deficient protein kinase 1</i>
<b>LacZ</b>	β-Galaktosidase
<b>LBD</b>	Liganden-bindende Domäne
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>max.</b>	maximal
<b>MBG</b>	Marinobufagenin
<b>MCP1</b>	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
<b>MDCK</b>	<i>Madin-Darby canine kidney epithelial</i>
<b>min</b>	Minuten
<b>MLC</b>	<i>myosin light chain</i>
<b>MR</b>	Mineralokortikoidrezeptor

---

---

<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium Ion
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NADPH</b>	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>NCBI</b>	<i>national center for biotechnology information</i>
<b>NCC</b>	Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Kotransporter
<b>NCX</b>	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher
<b>NCX1</b>	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauscher 1
<b>NF<sub>κ</sub>B</b>	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NHE</b>	<i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger</i>
<b>NLS</b>	<i>nuclear localisation sequence</i>
<b>NLS0</b>	<i>nuclear localisation sequence 0</i>
<b>NMDRG2</b>	<i>n-myc downstream regulated gene 2</i>
<b>nNOS</b>	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NTD</b>	N-terminale Domäne
<b>ONPG</b>	O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
<b>PAI1</b>	<i>plasminogen activator inhibitor 1</i>
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i>
<b>PI3K</b>	<i>phosphoinositid-3 kinase</i>
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PKD</b>	Proteinkinase D
<b>plzf</b>	<i>promyelocytic leukaemia zinc finger protein</i>
<b>PP2B</b>	Calcineurin
<b>PST-2238</b>	Rostafuroxin
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>qPCR</b>	<i>quantitative real time PCR</i>

---

---

<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>RAS</b>	Renin Angiotensin System
<b>rGR</b>	Glukokortikoidrezeptor der Ratte
<b>RhoA</b>	<i>ras homolog gene family member A</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i>
<b>ROC</b>	<i>receptor operated calcium channel</i>
<b>ROCK</b>	<i>rho-associated coiled-coil containing protein kinase</i>
<b>ROMK</b>	<i>renal outer medullary K<sup>+</sup> channel</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>ROX</b>	5-carboxy-X-rhodamin-succinidmidylester
<b>RU 38486</b>	Mifepriston, GR-Inhibitor
<b>SBFI</b>	<i>sodium binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl ester</i>
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat
<b>SEAP</b>	sekretorische alkalische Phosphatase
<b>SEM</b>	<i>standard error of mean</i>
<b>SERCA2</b>	<i>store operated calcium channel 2</i>
<b>SGK1</b>	Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase 1
<b>siRNA</b>	<i>silencer ribonucleic acid</i>
<b>SNAP</b>	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
<b>SOC</b>	<i>store operated calcium channel</i>
<b>SSP1</b>	Osteopontin bzw. Sekretorisches Phosphoprotein 1
<b>TEMED</b>	Tetramethylethyldiamin
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>TPR</b>	<i>total peripheral resistance</i>
<b>TRIS-HCl</b>	Tris-Hydrochlorid
<b>TRPC3/TRPC6</b>	<i>transient receptor potential cation channel subfamily C member 3/6</i>

---

---

<b>TRPM4</b>	<i>transient receptor potential cation channel subfamily M member 4</i>
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UE</b>	Untereinheit
<b>USP2-45</b>	Ubiquitin-spezifischen Protease 2-45
<b>Vol%</b>	Volumenprozent
<b>vs.</b>	versus
<b>VSMC</b>	<i>vascular smooth muscle cells</i>
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WNK4</b>	<i>WNK lysine deficient protein kinase 4</i>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorwort

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den Industrienationen [1]. Der Mineralokortikoidrezeptor (MR) spielt hierbei eine wichtige Rolle. So ist er bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie beteiligt, einem zentralen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Zudem zeigen zahlreiche klinische Studien bei Patienten mit kardialer Erkrankung den Nutzen einer MR-Blockade trotz optimaler antihypertensiver Therapie, was auf einen weiteren Hypertonie-unabhängigen Schädigungsmechanismus hinweist [2-4]. Deshalb rückte die mechanistische Analyse MR-abhängiger, renokardiovaskulärer Erkrankungen in den Fokus der Forschung.

## 1.2 Mineralokortikoidrezeptor

Der MR gehört wie der GR zur Superfamilie III der nukleären Rezeptoren. Sie wirken als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren [5], deren Aktivierung zu einer Veränderung der Proteinexpression führt [6]. Der wichtigste endogene Ligand des MR ist Aldosteron.

Das Gen des MR liegt auf Chromosom 4 in der Region q31.1 - q31.2, besitzt zehn Exons und eine Gesamtlänge von circa 450 Kilobasenpaaren [7]. Die ersten beiden Exons ( $1\alpha$  und  $1\beta$ ) dienen der Modulation der Transkriptstabilität und Translationseffizienz und enthalten zwei Promotoren (P1 und P2) [7]. P1 ist in allen klassischen Aldosteronzielgeweben aktiv, wohingegen P2 wahrscheinlich ausschließlich während der vorgeburtlichen Entwicklung aktiv ist [8, 9]. Aufgrund dieser beiden Promotoren entstehen zwei verschiedenen MR-mRNAs ( $hMR\alpha$  und  $hMR\beta$ ), was jedoch keinen Einfluss auf das Translationsprodukt hat, da die Translationsinitiationsstelle zwei Basenpaare (bp) stromabwärts im Exon 2 liegt und das Exon 1 somit nicht der Translation unterliegt.

Die verbleibenden acht Exons kodieren die klassischen vier Domänen der Steroidrezeptoren, die N-terminale Domäne (NTD; Exon 2), die DNA bindende Domäne (DBD; Exon 3 und 4), die Scharnierregion (D-Domäne) und die Liganden bindende Domäne (LBD; Exon 5-9) [7] (Abb. 1). Neben dem MR mit allen neun Exons existieren verschiedene, kürzere Splicevarianten mit noch unbekannter Funktion [9, 10].

Da in dieser Arbeit auch mit Zellen der Ratte gearbeitet wurde ist zu erwähnen, dass der MR der Ratte drei Promotoren im Exon eins besitzt ( $1\alpha$ ,  $1\beta$  und  $1\gamma$ ) und dass die Proteingröße mit

981 Aminosäuren (AS) nahezu identisch mit der des humanen MR ist [11]. Ferner konnte im Hippocampus der Ratte eine dritte mRNA Form des MR nachgewiesen werden (MR $\gamma$ ) [11].

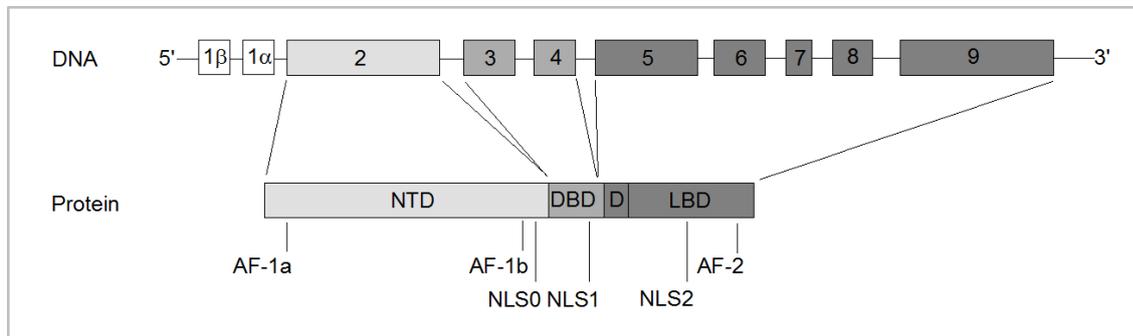


Abb. 1: Schematische Darstellung der MR-Exons und des MR-Proteins (modifiziert nach [9])

Die vier Domänen des MR-Proteins besitzen 984 AS [9]. Die N-terminale Domäne (NTD bzw. A/B-Domäne) des MR ist mit 602 AS die längste Domäne aller Steroidrezeptoren [9]. Auch unterscheiden sich MR und GR dort am stärksten voneinander (AS-Übereinstimmung < 15%), sodass der NTD eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von MR-spezifischen Effekten zugesprochen wird [9, 12, 13]. Einen wichtigen Beitrag zu dieser Rolle leisten die beiden Transaktivierungsdomänen (*activation function 1a* (AF-1a) und AF-1b) [13], da sie einen starken Zell- und Promotor-abhängigen Beitrag [14] zur Liganden-unabhängigen Transaktivierung und Repression leisten [9]. Zwischen AF-1a und AF-1b liegt eine inhibitorische Domäne, welche zum einen die Transaktivierungsaktivität von AF-1a und AF-1b hemmt [13] und zum anderen für die selektive Rekrutierung von Koregulatoren von Bedeutung ist. Somit trägt sie ebenfalls zur Vermittlung von MR-spezifischen Effekten bei [14]. Ebenfalls in der NTD liegt die Kernlokalisierungssequenz 0 (*nuclear localisation sequence 0* (NLS0)) [9], welche für die Regulierung der MR-Transaktivierungsaktivität von Bedeutung ist [15-17]. Die DNA-bindende Domäne (DBD bzw. C-Domäne) ist stark konserviert (94% AS-Übereinstimmung mit GR), weshalb MR und GR an dasselbe *hormone response element* (HRE) das *glucocorticoid response element* (GRE) binden [9]. Sie enthält zwei Zinkfingerdomänen. Erstere bindet mittels P-Box an die kleine DNA Doppelstrang Furche. Die Zweite ist mit ihrer D-Box für die Rezeptordimerisierung verantwortlich [9, 14, 18]. Zusätzlich beinhaltet die DBD zwischen beiden Zinkfingerdomänen ein Kernexportsignal [14, 18]. Die Verbindung von DBD und LBD stellt die Scharnierregion (bzw. D-Domäne) dar. Diese enthält eine Prolin-reiche Region, welche nach Ligandenbindung über die Konformationsänderung der DBD relativ zur LBD die MR-DNA-Interaktion und damit die Transaktion ermöglicht [18]. Weiterhin befindet sich die zwischen MR und GR schwach konservierte Kernlokalisierungssequenz 1 (NLS1) in der Scharnierregion [14, 18].

Die Liganden-bindende Domäne (LBD bzw. E/F-Domäne) besteht aus 251 AS, welche zu 55% mit denen der anderen Steroidrezeptoren übereinstimmen. Aldosteron bindet an 23 AS der Helices 1,3 und 5 bis 7 [9], wobei einzelne AS in der Helix 7 für die Hormonspezifität des MR verantwortlich sind [19]. Ebenfalls in der LBD enthalten ist die Kernlokalisierungssequenz 2 (NLS2) und die AF-2 [19]. Letztere formt nach Ligandenbindung eine hydrophobe Spalte mit LXXLL-Motiv, an welche Koaktivatoren binden [9].

#### *Funktionsmechanismus des MR*

Im inaktiven Zustand (ohne gebundenen Liganden) liegt der MR als hetero-oligomer Komplex mit HSP90 und indirekt mit HSP70, p23, p48, *FK506 binding protein 51* (FKBP-51) und Zyklophilin 40 (CyP-40) im Zytosol vor [20]. Dies stellt den aktivierbaren Zustand dar, der die Liganden-unabhängige Aktivierung verhindert [9]. Durch Ligandenbindung wird die NLS2 durch eine Konformationsänderung der LBD frei und es kommt zu einer Interaktion des Liganden-Rezeptor-Komplexes mit Dynein und Dynactin Motorproteinen (initiiert durch Austausch von FKBP-51 gegen FKBP-52), worauf der Transport des MR mit HSP90 in den Zellkern folgt [21]. Im Nukleus dissoziiert HSP90 vom MR, es kommt zur MR-Homodimerbildung und zur Aktivierung von Zielgenen durch Bindung an das HRE [5, 21, 22]. Als mögliche Dimerisierungspartner sind neben dem MR selbst (Homodimer) [9] der GR [23] und der Androgenrezeptor [24] (Heterodimere) beschrieben. Allerdings wird sowohl die Heterodimerbildung selbst- als auch deren Wirkungen kontrovers diskutiert [25].

### **1.3 Glukokortikoidrezeptor - Ein kurzer Vergleich**

Der GR ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor der Familie der nukleären Rezeptoren [26]. Er wird konstitutiv in allen Zellen exprimiert, wobei durch zellspezifische Einflüsse unterschiedliche Wirkungen im jeweiligen zellulären Kontext möglich sind [27]. Mit dem endogenen Ligand Kortisol ist er an der Steuerung einer Vielzahl von Prozessen wie z.B. Regulation von Stoffwechsel, Zellwachstum und -Volumen, Immunsystem, Entwicklung und Reproduktion beteiligt [28]. Die immunsuppressive Wirkung, welche u.a. durch die Hemmung des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF $\kappa$ B) vermittelt wird [29], ist hier von besonderem Interesse, da dieser einen möglichen Kompensationsmechanismus der proinflammatorischen MR-Wirkung darstellt.

Das Gen des GR liegt auf Chromosom 5 in der Region 5q31-32 und besteht aus 140 kbp, wovon jedoch nur 2% für die neun Exons des GR kodieren [30, 31]. Die Proteinstruktur des GR entspricht mit NTD, DBD, Scharnierregion und LBD dem typischen Aufbau aller

Steroidrezeptoren. Das Exon 1 kodiert für die *leading sequence*, in Exon 2 liegen die Informationen für die Transaktivierungsdomäne  $\tau_1$  der NTD, in Exon 3 und 4 die der beiden Zinkfinger motive der DBD und in Exon 5-8 die LBD mit ihrer Transaktivierungsdomäne  $\tau_2$ . Exon 9 kodiert für unterschiedliche carboxyterminalen Enden des GRs [30].

Von der Vielzahl beschriebener GR-Proteinvarianten [32] seien exemplarisch zwei mit unterschiedlichen 3'-Enden, GR $\alpha$  (9 $\alpha$  am 3'-Ende) und GR $\beta$  (9 $\beta$  am 3'-Ende), beschrieben [33]. GR $\alpha$  besitzt im Gegensatz zu GR $\beta$  eine durch Hydrokortison stimulierbare Transaktivierungsaktivität am GRE. Dies lässt sich durch den Ersatz von 50 AS der LBD des GR $\alpha$  gegen 15 AS im GR $\beta$  erklären [30]. Als Hauptfunktion des GR $\beta$  erscheint daher die Inhibition der GR $\alpha$ -Transaktivierungsaktivität [31], was die Assoziation von erhöhter GR $\beta$ -Expression mit Erkrankungen mit Glukokortikoidresistenz erklärt [34, 35].

Der inaktive GR $\alpha$  bildet im Zytosol einen Komplex mit HSP90, p23, FKPB-51, CyP-44 und der Proteinphosphatase 5 [25, 36]. Nach Ligandenbindung wird FKPB-51 durch FKPB-52 ersetzt, es erfolgt die Translokation in den Zellkern, die Dissoziation der Chaperone und schließlich die Bildung von Homodimeren welche an die DNA binden [31].

## 1.4 Aldosteron, MR und deren Wirkungen

Das Steroidhormon Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde synthetisiert und die Freisetzung durch die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Signalkaskade (RAAS) kontrolliert [37]. Kontrovers wird die extraadrenale Aldosteronsynthese diskutiert [38], wobei die vaskuläre, kardiale und zerebrale Synthese im Fokus stehen. Myokardial und vaskulär konnten die nötigen mRNA Transkripte [39, 40] sowie ein Anstieg der kardialen Aldosteronsynthese bei Herzinsuffizienz nachgewiesen werden [41, 42]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass sich kardiales Remodeling durch Nephrektomie verhindern lässt [43], sich die kardialen Aldosteronkonzentrationen auch durch die Plasmaspiegel des Aldosterons aus der Nebennieren erklären lassen [42] und die nachweisbaren kardialen / vaskulären Aldosteronsynthese-Konzentrationen sehr gering sind [44]. Im Gegensatz dazu ist die zerebrale Synthese akzeptiert [45]. Der Nachweis der Aldosteronproduktion gelang im Hippocampus, Gyrus dentatus und in den Körner- und Purkinjezellen [23].

### 1.4.1 Klassische Aldosteron-MR Wirkungen

Klassische Wirkungen von Aldosteron-MR betreffen die Na<sup>+</sup>- und damit verbundene Wasserretention, K<sup>+</sup>-Sekretion und H<sup>+</sup>-Exkretion in polarisierten Epithelien von Niere, Kolon und Schweißdrüsen [46].

Epitheliale Aldosteron-Zielgewebe exprimieren die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ II (11 $\beta$ -HSD II), welche biologisch aktives Kortisol in inaktives Kortison umwandelt [47, 48]. Dies erleichtert die Bindung von Aldosteron an den MR, da Kortisol und Aldosteron mit ähnlicher Affinität an den MR binden [48, 49] und das Aldosteron-Kortisol-Konzentrationsverhältnis bei etwa 1:100-1000 liegt [49, 50].

#### *Genomische Aldosteron-MR Wirkungen*

Einfluss auf die Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Homöostase nimmt der durch Aldosteron aktivierte MR durch Stimulation der Transkription von Untereinheiten des *epithelial Na<sup>+</sup> channel* (ENaC) [51], der basolateralen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (ATP1) [52], des *renal outer medullary K<sup>+</sup> channel* (ROMK) [53], des *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger* (NHE) [54, 55] und des Thiazid-sensitiven Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Kotransporter (NCC) [56] (Abb. 2a). Zusätzlich wird die Aktivität des ENaC durch indirekte genomische Effekte gesteigert. Der aktivierte MR stimuliert die Expression der Serum- und Glukokortikoid-induzierten Kinase 1 (SGK-1) [46], welche die Ubiquitin Ligase Nedd4-2 phosphoryliert [57, 58], sodass die Ubiquitylierung und damit der proteosomale Abbau des ENaCs gehemmt wird [58]. Durch die Stimulation der Ubiquitin-spezifischen Protease- (USP2-45) Expression fördert der MR die Deubiquitylierung des ENaCs und trägt somit weiter zu dessen Aktivitätssteigerung bei [59]. Ferner kommt es unter MR-Einfluss zur vermehrten Transkription des *connector enhancer of kinase suppressor of ras 3* (CNKSR3) und des *glucocorticoid leucine zipper protein* (GILZ), welche beide über eine Hemmung der *extracellular signal-regulated kinase 1 und 2* (ERK 1/-2) zu einer verstärkten ENaC-Aktivität beitragen [60, 61]. Auch die MR-abhängige Expressionssteigerung der *kidney specific with no lysine* [K] (KS-WNK1), führt über eine Aktivierung der Inositol-1,4,5-Triphosphat-(IP<sub>3</sub>) Kaskade zu einer gesteigerten ENaC-Aktivität [62-64] (Abb. 2a).

#### *Nichtgenotrope Aldosteron-MR Wirkungen*

In den 1980ziger Jahren konnte gezeigt werden, dass die MR-Antagonisten Spironolacton und Canrenon nicht alle Aldosteron-MR Wirkungen blockieren [65]. Nicht-genotrope Effekte finden schnell innerhalb von Sekunden bis Minuten statt und können sowohl kurz- als auch langanhaltende Wirkungen haben [66]. Ferner kann zwischen MR-abhängigen und MR-unabhängigen, nichtgenotropen Aldosteronwirkungen unterschieden werden [17, 67].

Die MR-unabhängigen, nichtgenotropen Aldosteron-Effekte werden über *second messenger* Systeme (z.B. Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, Aktivierung von Proteinkinasen), einen Einfluss auf den intrazellulären pH [17, 68, 69] und über den auf der Zelloberfläche exprimierten Aldosteronrezeptor *G protein-coupled receptor 30* (GPR30) vermittelt [67]. So kommt es durch Aldosteron, wahrscheinlich GPR30 vermittelt, zu einer



eines nichtgenomischen *cross talk* zwischen nichtgenomischer MR-unabhängiger und -MR-abhängiger Aldosteronwirkung.

#### *Cross Talk zwischen genomischen und nichtgenotropen Aldosteron-MR-Wirkungen*

Nicht nur zwischen den MR-abhängigen- und MR-unabhängigen, nichtgenotropen Aldosteronwirkungen existieren Interaktionen, sondern auch zwischen den genotropen- und nichtgenotropen Aldosteron-MR-Wirkungen [15, 17].

A) Eine Verstärkung der MR-Transaktivierungsaktivität kann durch die nichtgenotrope Aldosteron-MR-abhängige Konzentrationssteigerung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und über die nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) induziert werden [16, 75, 76] (Abb. 2b). Ebenso führt die nichtgenomisch vermittelte Aktivierung der ERK 1/-2 (Phosphorylierung) zu einer gesteigerten MR-Transaktivierungsaktivität, möglicherweise über eine AB-Domänen-abhängige, verstärkte MR-Translokation in den Nukleus [17, 74]. Eine Beteiligung der PKC $\alpha$  an diesem Effekt wird angenommen, aber kontrovers diskutiert [15, 16, 77]. Neben dieser generellen Verstärkung der genomischen MR-Aktivität durch die nichtgenotrope Wirkung bestehen auch spezifische Synergieeffekte. So stimulieren sowohl die genomische MR-Wirkung (über KS-WNK1 und SGK-1), als auch die nichtgenotrope Aldosteron-Wirkung (über GPR30 und IP<sub>3</sub>-Kaskade) die Aktivität des ENaCs [62-64, 67]. Für den NHE ist ebenfalls ein synergistischer Effekt beschrieben, indem die genomische Aldosteron-MR-Wirkung die *de novo* Synthese fördert und die nichtgenotrope Wirkung zu einer Affinitätssteigerung beiträgt [54, 55].

B) Andererseits sind hemmende Wirkungen zwischen der nichtgenotropen- und genomischen MR-Wirkung bekannt, die Teil negativer Rückkopplungsschleifen sind. Hierbei hemmt Aldosteron GPR 30-vermittelt die MR-Expression in Primärkulturen von glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) der Wistar-Kyoto Ratte [67]. Ferner hemmt der nichtgenotrope Aldosteron-MR-induzierte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Anstieg (über EGFR und ERK 1/-2) ebenfalls die MR-Expression [15] (Abb. 2b). Auch für die ENaC-Aktivität bestehen nichtgenotrope, Aldosteron-MR-abhängige negative Rückkopplungsschleifen über das *promyelocytic leukaemia zinc finger protein* (plzf) und den EGFR (über ERK 1/-2) [61, 78]. Vice versa stimuliert die genomische MR-Aktivität die Proteinexpression von GILZ und CNKSR3, die eine verminderte ERK 1/-2 Phosphorylierung bewirken und somit einen hemmenden Einfluss auf die nichtgenotropen Aldosteron-MR-Wirkung (ERK 1/-2 Phosphorylierung) haben [60, 61] (Abb. 2a).

### 1.4.2 Nichtklassische Aldosteron-MR-Wirkungen I - Hypertonie und Interaktionen mit Ouabain

Unter den nichtklassischen Aldosteron-MR-Wirkungen werden alle Wirkungen subsumiert, welche über die beschriebenen epithelialen MR-Wirkungen hinausgehen.

Arterielle Hypertonie betrifft alters- und populationsabhängig 10- bis 40% der Bevölkerung [79] und zählt weltweit zu einer der Erkrankungen mit der höchsten Morbidität [80]. J.W. Conn beschrieb bereits 1955, dass Aldosteronüberschuss zu einer Hypertonie und Hypokaliämie führt [81]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass erhöhte Aldosteronspiegel ein ausgezeichneter Prädiktor der Hypertonie sind [82]. Primärer Hyperaldosteronismus ist zusätzlich die häufigste (und gut therapierbare) Form der sekundären Hypertonie [83]. Bevor im Folgenden auf die Entstehungsmechanismen der Aldosteron-MR-bedingten Hypertonie eingegangen wird, soll auf ein weiteres Hormon das wahrscheinlich maßgeblich an der Entwicklung der Aldosteron-MR-bedingten Hypertonie und der Hypertonie-unabhängigen renokardiovaskulären Schäden beteiligt ist, eingegangen werden: Ouabain.

#### *Ouabain - Eine kurze Charakterisierung*

Das kardiotope Steroid Ouabain wurde 1991 *in vivo* entdeckt [84]. Synthese und Sekretion erfolgen im Hypothalamus [85] und in der Nebennierenrinde [85], wobei zirkulierendes Ouabain seine eigene Sekretion hemmt [86]. Physiologische Ausschüttungsstimuli stellen das adrenokortikotrope Hormon, Angiotensin II (Ang II), Katecholamine [87, 88] und erhöhte Na<sup>+</sup>-Konzentrationen von Plasma und Liquor dar [88, 89].

Funktionell dient Ouabain der Langzeit-Blutdruckregulation indem es den Blutdruck steigernden Effekt einer NaCl-reichen Ernährung hemmt (durch Stimulation der Natriuresis) [86] und vice versa den Blutdruck senkenden Effekt einer NaCl-armen Diät reduziert (durch RAS-Aktivierung [89]) [90, 91]. Die Wirkung beruht auf zwei ATP1-vermittelten Mechanismen. A) Die kardiotoxischen Steroide hemmen die  $\alpha$ -Untereinheit der ATP1 [92]. Von der humanen  $\alpha$ -Untereinheit der ATP1 existieren vier verschiedene Isoformen (ATP1A1, ATP1A2, ATP1A3, ATP1A4), wobei im Zusammenhang mit der Hypertonie vor allem die ersten beiden von Interesse sind [93]. Die ATP1A1 wird nahezu ubiquitär exprimiert [94] und macht etwa 80% aller zellulären ATP1 aus. Die fehlenden 20% entsprechen der ATP1A2, mit Ausnahme von Neuronen (zusätzliche ATP1A3-Expression) [95, 96] und Skelettmuskelzellen (zusätzliche ATP1A4-Expression) [97].

Hinsichtlich der Ouabain-Affinität der ATP1 gibt es beim Menschen kaum Unterschiede. Die halbmaximale effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) der ATP1A1 und ATP1A2 liegt bei 10 - 20 nmol/l [93, 98], wobei die physiologischen Ouabainkonzentrationen im Bereich von 0,1 - 0,35

nmol/l liegen [99]. Pathophysiologisch ist eine Steigerung auf bis zu 10 nmol/l möglich [100]. Da jedoch die Ouabain-spezifische Assoziations- und -Dissoziationskonstante der ATP1A2 höher sind als die der ATP1A1 wird spekuliert, dass die ATP1A2 häufiger Ouabain bindet als die ATP1A1 [98]. Daher wird vor allem von einem Ouabain-Einfluss auf die ATP1A2 ausgegangen, mit vernachlässigbarem Effekt auf die ATP1A1 [101]. Die ATP1A2 befindet sich im Gegensatz zur ATP1A1 in enger räumlicher Nähe zum Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (NCX) [102], dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und nichtselektiven Kationen-Kanälen (*receptor operated calcium channel* (ROC) und *store operated calcium channels* (SOC)) und bildet mit diesen eine funktionelle Einheit, das Plasmerosom. Dieses ist für die Aufrechterhaltung der Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung und die Füllung des ER mit Ca<sup>2+</sup> verantwortlich [103]. Über eine Hemmung der ATP1A2 vermittelt Ouabain einen Anstieg der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration, wodurch die Aktivität des NCX vermindert wird und die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt [104] (Abb. 3). Dieser Effekt kann bereits durch nanomolare Ouabainkonzentrationen ausgelöst werden, was die physiologisch relevante Funktion dieses Hormons für die Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung bzw. die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase veranschaulicht [105].

B) Der zweite Wirkmechanismus beruht auf der Modulation intrazellulärer Signalkaskaden durch Aktivierung der Signaltransduktionsdomäne der ATP1 [106]. Nach Ouabainbindung kommt es Caveolin vermittelt zu einer *cellular and sarcoma* (c-Src) Kinasenaktivierung, welche über eine EGFR-Transaktivierung als Zwischenschritt [107] Einfluss auf *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), wie zum Beispiel ERK 1/-2 oder p38, nimmt. Über ERK 1/-2 bzw. p38 kommt es zur Stimulation der NCX-Aktivität sowie Proteinexpression von ROC und SOC [108, 109] (Abb. 3). Dadurch übt Ouabain auch unabhängig von der intrazellulären Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Verhältnis einen Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase aus [109-111]. Über beide Wirkmechanismen des Ouabains erscheint eine Interaktion mit der genomischen MR-Wirkung möglich, doch liegen diesbezüglich keine gesicherten Ergebnisse vor.

#### *Entstehungsmechanismen der Aldosteron-MR bedingten Hypertonie - zentrale Mechanismen*

Der Blutdruck errechnet sich aus dem Produkt von Herzminutenvolumen (HMV) und totalem peripheren Gefäßwiderstand (TPR). Nachdem als Hypertonie Ursache das durch die Aldosteron-induzierte Volumenexpansion gesteigerte HMV ausgeschlossen wurde [112], rückte die Modulation des TRP selbst in den Mittelpunkt des Interesses [113, 114]. Hierbei lassen sich zentrale und periphere Mechanismen unterscheiden, die beide einen Einfluss auf den TPR haben und sich zusätzlich gegenseitig beeinflussen [89].

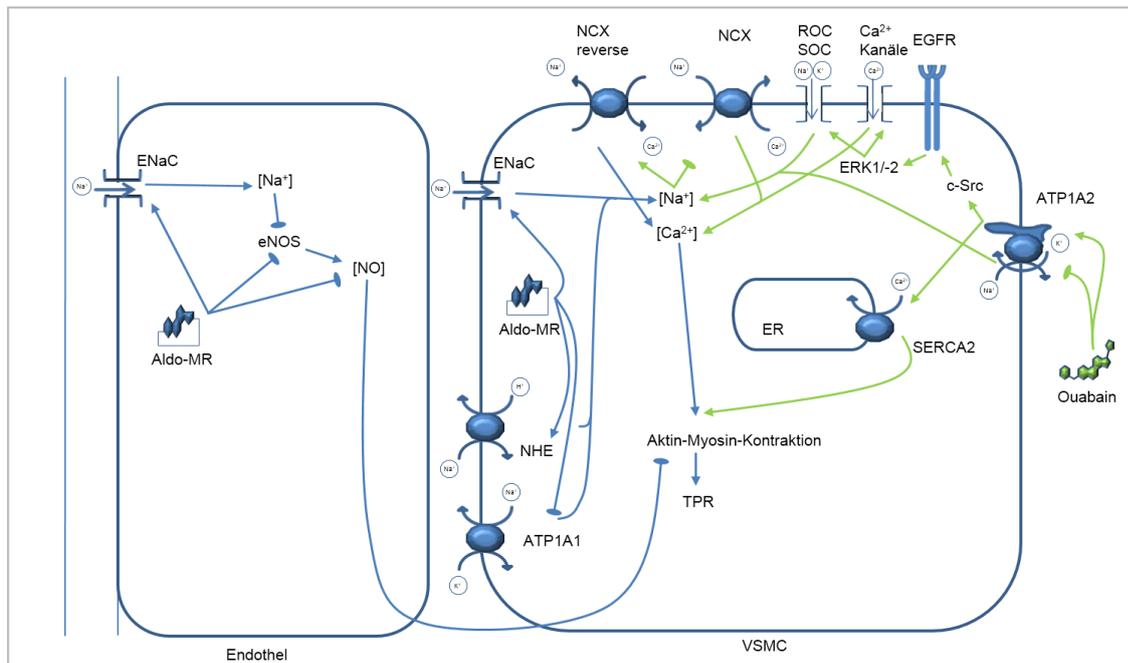


Abb. 3: Wirkmechanismen des Ouabains (grün) und deren mögliche Interaktionen mit Aldosteron-MR-Wirkungen (blau) bei den peripheren Entstehungsmechanismen der NaCl-abhängigen Hypertonie. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Aldosteron-MR-abhängigen EGFR- und ERK 1/-2 Wirkungen nicht dargestellt (Abb. 2b). Pfeilspitzen entsprechen einer stimulierenden-, Ellipsen einer hemmenden Wirkung. (ATP1A1 = Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Isoform A1; ATP1A2 = Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase Isoform A2; Aldo-MR = durch Aldosteron aktivierter Mineralokortikoidrezeptor; c-Src = *cellular and sarcoma kinase*; EGFR = *epithelial growth factor receptor*; ENaC = *epithelial Na<sup>+</sup> channel*; eNOS = endotheliale NO-Synthase; ER = endoplasmatisches Retikulum; ERK 1/-2 = *extracellular-signal regulated kinase 1 und -2*; NCX (reverse) = Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (*reverse mode*); NHE = Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger; ROC = *receptor operated calcium channel*; SERCA2 = *store operated calcium channel 2*; SOC = *store operated calcium channel*; TPR = totaler peripherer Gefäßwiderstand; VSMC = *vascular smooth muscle cell*)

Unter zentralen Mechanismen wird die Regulation des Sympathikotonus verstanden, welcher über  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren einen maßgeblichen Einfluss auf die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration hat. Dies beeinflusst über das Kontraktionsverhalten der VSMC [115] bzw. den TPR und damit den Blutdruck [116] und ist für die Langzeit-Blutdruckregulation von Bedeutung [117]. Eine Schlüsselfunktion bei der Hypertonieentwicklung scheint dem NaCl zuzukommen. Im Durchschnitt werden in den Industrienationen 5-10 g NaCl/Tag eingenommen, wobei vom physiologischen Standpunkt 1 g/Tag ausreichend ist [118]. Eine NaCl-reiche Ernährung führt in Ratten zu einer Steigerung der Na<sup>+</sup>-Konzentration im Liquor cerebrospinalis [119], worauf eine schnelle Aktivierung zirkumventrikulärer Organe (z.B. organum subfornicale oder Nucleus supraopticus) folgt die über eine Sympathikusaktivierung zu einem Ang II-vermittelten Blutdruckanstieg führt [120]. Nach Tagen bis Wochen kommt es in Dahl Salzsensitiven Ratten zu einer gesteigerten zentralen Synthese von Aldosteron [121] welche die zentrale Ouabainsekretion stimuliert. Dies steigert die Ang II-Freisetzung und Angiotensin<sub>1</sub>-

Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) -Expression und führt somit zu einer langfristigen Steigerung des Sympathikotonus bzw. des Blutdrucks [122]. Die Entwicklung einer Hypertonie nach intraventrikulären Ouabain-Gaben bzw. die Hemmung der Hypertonieentwicklung durch intraventrikuläre Applikation Ouabain-spezifischer-Antikörper [123, 124] unterstreicht die Rolle des Ouabains. Als essentiell für die Ouabainwirkung wurde in Mäusen die ATP1A2 erkannt [124]. Dass es sich hierbei um einen NaCl-spezifischen Effekt handelt, der sich nicht durch eine Veränderung in der Osmolalität erklären lässt, zeigt die Tatsache, dass durch äquimolares Mannit keine Veränderungen des Blutdrucks nachgewiesen werden konnte [125].

Auch Aldosteron und der MR leisten einen diesbezüglich relevanten Beitrag. So stimuliert die intraventrikuläre Aldosteronadministration die Ouabainsekretion und die nachfolgende hypertensive Sympathikusaktivität bzw. vice versa wird dies durch die gleichzeitige intraventrikuläre Gabe eines MR-Antagonisten zusätzlich zu NaCl gehemmt [121, 126].

Ein weiterer zentraler Mechanismus, der zur Entwicklung einer Hypertonie beiträgt, findet sich eventuell in der Desensitivierung des zentralen Barorezeptorreflexes [114], wobei als Auslöser eine nichtgenotrope Aldosteronwirkung diskutiert wird [127].

#### *Entstehungsmechanismen der Aldosteron-MR bedingten Hypertonie - periphere Mechanismen*

Eine hohe NaCl-Aufnahme führt auch zu einer Erhöhung der Na<sup>+</sup>-Konzentration im Blut um 1-3 mmol/l [113]. Zusätzlich konnte im Interstitium und Lymphgeweben von NaCl-reich ernährten Tieren ein lokaler NaCl-Anstieg um 40 - 110 mmol/l nachgewiesen werden [128]. Eine Aldosteron-MR-abhängige Aktivierung von NHE [69, 129], ENaC [130] und die transiente Hemmung der ATP1 [71] führen dabei zu einer Na<sup>+</sup>-Retention in den VSMC. Dies senkt die Triebkraft des NCX oder aktiviert dessen *reverse mode* (Na<sup>+</sup>-Export zugunsten des Ca<sup>2+</sup>-Imports), wodurch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration steigt und es über eine Tonussteigerung der glatten Muskulatur zu einer TPR-Zunahme kommt (Abb. 3). Unterstützt wird dies durch eine Aldosteron-MR-abhängige Hemmung der endothelialen Stickstoffmonoxid- (NO) Synthese durch die endotheliale ENaC-Aktivierung [131].

Vaskulär fungiert Ouabain unter physiologischen Bedingungen als Antagonist der Aldosteron-MR-abhängigen TRP-Steigerung. Durch die endothelial exprimierten ATP1A2, NCX und TRPC [132, 133], steigern auch hier (sub)nanomolare Ouabainkonzentrationen die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [132, 134]. Im Gegensatz zu den VSMC, führt dies in Endothelien über eine Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) zu einer Vasodilatation [135, 136]. Auch Aldosteron und der MR stimulieren unter physiologischen Bedingungen durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration die Aktivität der

eNOS und tragen so ebenfalls zu einer Verringerung des Vasotonus bei [137, 138]. Unter einer NaCl-reichen Ernährung kommt es jedoch Aldosteron-MR-abhängig zu einer vermehrten NO-Inaktivierung und eNOS-Entkopplung [131, 138, 139] (Mechanismen Kapitel 1.4.3), wodurch der relaxierende Effekt beider Hormone auf die VSMC gehemmt wird und die vasokonstriktorische Wirkkomponente überwiegt [140, 141].

Eine weitere Folge der verminderten NO-Konzentration ist die gesteigerte renale Na<sup>+</sup>-Reabsorption durch geringere Vasodilatation der Vasa recta, wodurch wiederum die Ouabain-Sekretion stimuliert wird und sich ein selbst erhaltener Kreislauf schließt. Daher bedarf es langfristig keines erhöhten Sympathikotonus zur Aufrechterhaltung der Hypertonie [89, 132]. Diese Ergebnisse werden dadurch gestützt, dass 45 % aller Patienten mit essentieller Hypertonie erhöhte Ouabainkonzentrationen zeigen [91] und die Ouabaininfusion bei gesunden Probanden zu einer Erhöhung des TPR führt [142]. Seine vasokonstriktorische Wirkung entfaltet Ouabain über die Hemmung der ATP1A2 in den VSMC. Darauf folgt eine intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Retention mit nachfolgender Steigerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [143] (Abb. 3). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der ATP1A2-Expression zu einer Hypertonie- [87, 144] und die stimulierte Expression der ATP1A2 zu einer Hypotonie führt [145]. Eine Modulation der Expression der ATP1A1 hatte hingegen keinen Einfluss auf den Blutdruck [96, 145]. Ferner wurde gezeigt, dass 70 % des durch Ouabain-induzierten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs in Kardiomyozyten durch den NCX-*reverse-mode*-Inhibitor KB-R7943 gehemmt werden konnten [146]. Die Tatsache der Vergesellschaftung von NCX-Polymorphismen in der japanischen Bevölkerung mit arterieller Hypertonie ist dabei ein Indiz für die Übertragbarkeit dieser Theorie auf den Menschen [147].

Die mit einer chronischen Hypertonie einhergehende, langanhaltend erhöhte Ouabainkonzentration führt zu einer Expressionsmodulation von Proteinen des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Haushalts, im Sinne eines funktionellen Remodelings [89]. Ouabain stimuliert über die Signaltransduktionsdomäne der ATP1A2 in VSMC [89] die Expression des NCX und der SERCA2 [101, 108, 148]. NCX-abhängig kommt es im Anschluss zu einer gesteigerten Expression des *transient receptor potential gated channel 6* (TRPC6), einem membranären Ca<sup>2+</sup>-Kanal [108], welcher wiederum von Ouabain aktiviert werden kann [110]. Langfristig steigert Ouabain auch auf diesem Wege, die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und -Speicherung.

Zusammenfassend können für Ouabain, Aldosteron und den MR synergistische, vasokonstriktorische Effekte an den VSMC angenommen werden, was auch die periphere Verflechtung beider Hormone in der NaCl-abhängigen Hypertonieentwicklung unterstreicht.

Doch trotzdem der Zusammenhang zwischen VSMC-Tonussteigerung und Na<sup>+</sup> bereits seit 1960 bekannt ist, ist die Rolle des NaCl auf molekularer Ebene noch immer nicht abschließend geklärt [89].

### 1.4.3 Nichtklassische Aldosteron-MR-Wirkungen II - Induktion eines proinflammatorischen Milieus und des Remodeling

Mehrere klinische Studien (EPHESUS-, 4E- und RALES-Studie) zeigen einen Vorteil einer zusätzlichen Eplerenon- bzw. Spironolacton-Therapie bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion bezüglich Mortalität und Morbidität [2-4]. Die Studie von Zannad et al. zeigt darüber hinaus einen therapeutischen Nutzen der zusätzlichen MR-Blockade bei kardialer Erkrankung selbst unter optimaler antihypertensiver Therapie [149, 150]. Ein Hypertonie-unabhängiges, NaCl-Aldosteron-MR-abhängiges, kardiales Remodeling wurde auch im Tiermodell nachgewiesen. So wurde die protektive Wirkung von Spironolacton in Abwesenheit einer Hypertonie [151] und ein durch Aldosteron- und NaCl-induziertes kardiales Remodeling in Abwesenheit einer Hypertonie nachgewiesen [152-154]. Eine schädigende Wirkung ließ sich darüber hinaus auch renal und vaskulär nachweisen [46, 155-157]. Unabhängig von der hypertensiven Wirkung, besteht somit eine weitere klinische relevante, pathophysiologische Aldosteron-MR-Wirkung, welche über eine Vaskulopathie (Inflammation und Fibrose) zu renokardiovaskulären Endorganschäden führt [3, 4, 154].

#### *Schaffung eines proinflammatorischen Milieus durch Hemmung des zellulären Oxidationsschutzes*

Im Tier- und Zellmodell konnte renokardiovaskulär nach Aldosteron- und NaCl-Gabe der Anstieg von Entzündungsparametern (z.B. NAD(P)H-Oxidase, *activating protein 1* (AP1), NF<sub>κ</sub>B, Osteopontin (OSP1)) nachgewiesen werden [155, 156, 158-160].

Einen entscheidenden Beitrag zur Induktion des proinflammatorischen Milieus stellen die Verminderung des antioxidativen Schutzes und die nachfolgende Verschiebung des zellulären Redoxstatus zur oxidativen Seite dar. Die Behandlung von VSMC der Ratte mit Aldosteron und NaCl verursacht eine Aktivitätsreduktion der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und 6-Phosphoglukonatdehydrogenase (6PGD) [161]. Dies vermindert die Nikotinamadeninindinukleotidphosphat- (NADPH) Konzentration, wodurch die Konzentration von reduziertem Glutathion abnimmt [162]. Die Konsequenz sind erhöhte Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die konsekutive Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP1 und NF<sub>κ</sub>B [163].

Ein dafür verantwortlicher Mechanismus stellt die nichtgenomische, MR-abhängige Akti-

vierung der Proteinphosphatase Calcineurin (PP2B) dar [164] (Abb. 4). Durch die folgende Dephosphorylierung des *cAMP response element binding protein* (CREB) kommt es zu einer reduzierten Stimulation der *cAMP binding element*- (CRE) abhängigen Transkription der G6PD [165]. Synergistisch wirkt die frühe Aldosteron-abhängige mRNA-Hochregulation von *cAMP responsive element modulator* (CREM) die ebenfalls zu einer CREB-Dephosphorylierung führt [59, 164]. Kontrovers diskutiert wird ein Aldosteron-MR-abhängiger Anstieg des cAMPs. Beschrieben sind PKA-abhängige Aktivitätsminderungen der G6PD durch Dephosphorylierung [161] und eine cAMP-abhängige Stimulation der G6PD-Transkription [164]. Auch Ouabain-abhängig nehmen die intrazellulären ROS-Konzentrationen zu [109, 111]. Eine mögliche Erklärung dafür, ist die nachgewiesene Aktivitätsreduktion der G6PD durch Aldosteron und Ouabain [161].

#### *Profibrotische Wirkung*

Aldosteron und der MR stimulieren in humanen VSMC die Prolinaufnahme, die Synthese von Fibronectin, die Sekretion von Kollagen Typ I und –III, wodurch eine gesteigerte Synthese von Extrazellulärmatrix zu verzeichnen ist [166-168].

Von zentraler Bedeutung für die Aldosteron-MR-induzierte fibrotische Wirkung ist die EGFR-Aktivierung, da diese mit gesteigerter Zellproliferation und renokardiovaskulären Remodeling-Prozessen einhergeht [169]. Dabei sensibilisiert Aldosteron den EGFR für EGF [170] und der aktivierte MR führt über eine c-Src-Kinasenaktivierung zur EGFR-Transaktivierung [17, 171]. Zusätzlich wird durch das im EGFR-Promoter enthaltene *mineralocorticoid receptor response element* die EGFR-Expression im Gefäßsystem, Herz und Niere durch den MR stimuliert [17, 41, 166] (Abb. 4). Seine Wirkung entfaltet der EGFR über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. *cellular myelocytomatosis viral oncogene homolog* (cMyc) und MAP Kinasen) [17, 171]. Von besonderem pathophysiologischen Interesse scheint die MR-EGFR-abhängige Aktivierung des NHE zu sein [172, 173], da sowohl die MR-Hemmung mit Canrenoat als auch die NHE-Hemmung mit Cariporid den Anstieg der Entzündungsparameter ED1, und SSP1 sowie die gesteigerte Kollagenablagerung hemmen, welche in Ratten unter Administration des Mineralokortikoids Deoxykortikosteronacetat (DOCA) und NaCl kardial auftreten [173] (Abb. 4). Die NHE-Aktivität wird dabei durch eine Steigerung der Na<sup>+</sup>-Affinität, erhöhte Translokation in die Plasmamembran und Stimulation der *de-novo* Synthese erhöht [54]. Dabei wird von genomischen- als auch nichtgenomischen MR-Wirkungen ausgegangen [54, 55, 74].

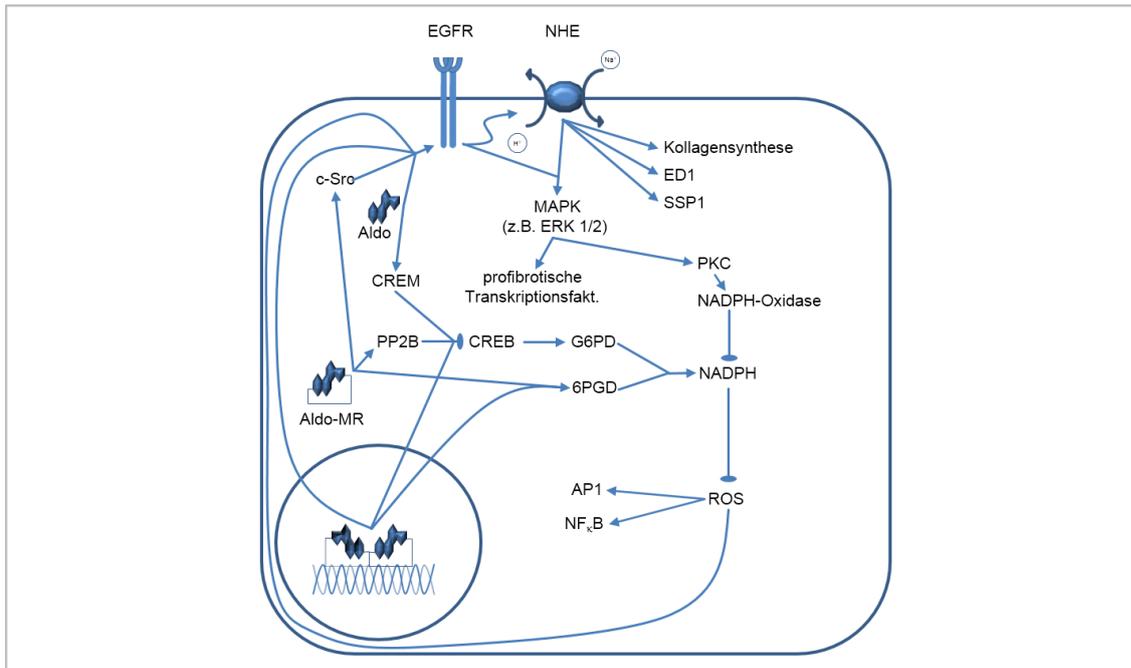


Abb. 4: Mechanismen der Induktion eines proinflammatorischen und profibrotischen Milieus durch Aldosteron und den MR. Pfeilspitzen entsprechen einer stimulierenden-, Ellipsen einer hemmenden Wirkung. (6PGD = 6-Phosphoglukonatdehydrogenase; Aldo = Aldosteron; Aldo-MR = durch Aldosteron aktivierter Mineralokortikoidrezeptor; AP1 = activator protein 1; c-Src = cellular and sarcoma kinase; CREB = cAMP response element binding protein; CREM = cAMP response element modulator; ED1 = proinflammatorischer Marker für aktivierte Monozyten, Makrophagen und Mikroglia in Ratten; EGFR = epithelial growth factor receptor; ERK 1/-2 = extracellular-signal regulated kinase 1 und -2; G6PD = Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; MAPK = mitogen-activated protein kinase; NF<sub>κ</sub>B = nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; NHE = Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger; PKC = Proteinkinase C; PP2B = Calcineurin; ROS = reactive oxygen species; SSP1 = Osteopontin)

#### Verbindung von proinflammatorischer und profibrotischer Wirkung

Die Aldosteron-MR-abhängige Aktivierung des EGFRs leistet nicht nur einen profibrotischen Beitrag, sondern stimuliert darüber hinaus auch die proinflammatorische Aldosteron-MR-Wirkung. So konnte eine Aldosteron-MR-induzierte Steigerung der NADPH-Oxidase-Aktivität in Endothelien, VSMC, Herz und Niere beobachtet werden, wodurch der NADPH-Verbrauch und die ROS-Konzentration steigt [157, 174, 175]. Dieser Beobachtung liegt wahrscheinlich eine c-src-Kinase-Phosphorylierung durch den Aldosteron-MR-Komplex zugrunde [168], welche zu einer EGFR-Transaktivierung führt [17, 171], was über die MAPK (ERK 1/-2) und die PKC zu einer gesteigerten NADPH-Oxidase-Aktivität führt (Abb. 4) [55, 168]. Vice versa stimuliert das proinflammatorische Milieu die profibrotische Wirkung, da die Aktivität des EGFR durch gesteigerte ROS-Konzentrationen stimuliert wird [176].

## 1.5 Regulation der MR-Aktivität

Klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass die renokardiovaskulären Schäden unabhängig von erhöhten Aldosteronspiegeln auftreten [3, 4, 154, 177]. Diese Befunde verdeutlichen, dass sich die MR Wirkung nicht alleine durch seinen Ligand erklären lässt, sondern weitere Faktoren existieren [178].

### *Regulatoren der MR-Aktivität*

Als regulatorische Angriffspunkte der MR-Aktivität lassen sich die Prä- und Postrezeptorebene, sowie die Rezeptorebene selbst unterscheiden.

Ein wichtiger MR-Regulator der Prärezeptorebene v.a. in epithelialen Geweben ist die 11 $\beta$ -HSD II [47, 48]. Auf der Postrezeptorebene sind eine Vielzahl an allgemeinen und speziellen Koregulatoren bekannt [179, 180]. Exemplarisch seien die nukleäre DNA-Helikase II als MR-spezifischer Koaktivator und der *protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1* als MR-spezifischer Korepressor genannt [13].

Auf der Rezeptorebene sind vier relevante Regulationsmechanismen zu nennen: Das MR-Expressionsniveau, die intrazellulären Signalkaskaden, die posttranslationalen Modifikationen und der Redoxstatus. Das MR-Expressionsniveau unterscheidet sich zwischen unterschiedlichen Zelltypen [14] und auch auf mRNA-Ebene finden sich Unterschiede zwischen GR und MR [181], was auf Unterschiede in deren Transkriptionsregulation hindeutet [9]. GPR30 konnte dabei kürzlich als ein neuer negativer Regulator der MR-Transkription nachgewiesen werden [67, 182].

Die MR-Transaktivierungsaktivität wird durch intrazelluläre Signalkaskaden moduliert [183, 184]. So wurde eine stimulierende Wirkung von cAMP, der PKA und dem phosphorylierten ERK 1/-2 nachgewiesen [17, 49, 50, 185], wobei die Wirkung über die AB-Domäne des MR [15] und durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung von Koregulatoren vermittelt wird [76]. Ferner konnte für erhöhte zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf die MR-Aktivität gezeigt werden [15].

Auf der Postrezeptorebene sind die posttranslationalen Modifikationen des MR zu nennen, über die bisher wenig bekannt ist [9]. Phosphorylierungen durch die Proteinkinase C (PKC) mit unklarer Wirkung auf die MR-Transaktivierungsaktivität sind beschrieben [16, 77]. Daneben existieren auch Konsensussequenzen, für die *small ubiquitin-like modifier* [186] in der NTD und LBD [13]. Auch die Ubiquitylierung an putitiven Lysinresten der NTD und D-Domäne ist nachgewiesen, wodurch der MR dem proteosomalen Abbau zugeführt und die zelluläre MR-Aktivität letztlich vermindert wird [9]. Ferner werden Neddylierungen und Acetylierungen des MR vermutet [14]. Darüber hinaus sind Karbonylierungen und

Nitrosylierungen bekannt, welche mögliche Vermittler des Einflusses des zellulären Redoxstatus auf den MR sind [187, 188]. So stimulieren der Peroxynitrit-Donor 3-Morpholinosydnonimin-Hydrochlorid und das Glutathion verbrauchende Reagens L-Buthionin-S/R-Sulfoximin die Aldosteron-unabhängige MR-Translokation in den Zellkern und dadurch die MR-Transaktivierungsaktivität [187, 189]. Außerdem konnte in Mäusen mit eNOS-Knockout durch Aldosteron eine verstärkte, vaskuläre Zellproliferation und Ablagerung von Extrazellulärmatrix als in Vergleichstieren nachgewiesen werden [190]. In Übereinstimmung dazu konnte eine Hemmung der MR-Aktivität durch den NO-Donor S-Nitros-N-Acetyl-DL-Penicillamin gezeigt werden [187].

## 1.6 Rolle des NaCl in der pathophysiologischen MR-Aktivität

Bisher unklar ist, auf welchem Weg die pathophysiologische MR-Aktivierung erfolgt. Da die Patienten der klinischen Studien zum Nutzen einer MR-Blockade bei kardialer Erkrankung keine erhöhten Aldosteronkonzentrationen aufwiesen [3, 4] und künstliche Konzentrationssteigerung ohne eine gleichzeitige NaCl-Gabe keine schädigende Wirkung besitzen [177] ist eine gesteigerte Aldosteronkonzentration nicht verantwortlich. Ferner ist eine hohe NaCl-Zufuhr ist für die Entwicklung Aldosteron-MR-abhängiger renokardiovaskulärer Schäden essentiell [129, 155, 160, 191], was den protektiven Effekt einer NaCl-armen Diät erklärt [155, 191, 192]. Jedoch liegen über den Einfluss einer extrazellulären NaCl-Erhöhung auf die transkriptionelle Aktivität des MR keine Ergebnisse vor. Es existieren lediglich zwei Theorien zur Entstehung einer pathophysiologischen MR-Aktivität unter NaCl-Einfluss. Einerseits könnte ein durch NaCl-induziertes proinflammatorisches Milieu die Affinität des MR für Aldosteron erhöhen, sodass dessen Transaktivierungsaktivität bei gleichbleibender, nicht pathologisch erhöhter Ligandenkonzentration steigt [46].

Die zweite Theorie, von Funder *et al.* postuliert, zieht die Aktivierung des MR durch Glukokortikoide in Betracht, welche unter physiologischen Bedingungen als MR-Antagonisten fungieren [193-195]. Diese binden mit ähnlicher Affinität wie Aldosteron an den MR [48, 49], deren Konzentration liegt um den Faktor 100 bis 1000 über der des Aldosterons [49, 50, 185] und zusätzlich wird der MR in nichtepithelialen Gewebe wie z.B. dem Herz nicht durch die kortisolinaktivierende 11 $\beta$ -HSD II geschützt [47, 48]. Daher könnten die Glukokortikoide in einem proinflammatorischen Milieu zu MR-Agonisten werden und eine gesteigerte MR-Transaktivierungsaktivität verursachen [45, 196, 197].

## 1.7 Zielstellungen

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, inwiefern eine Steigerung der extrazellulären NaCl-Konzentration einen Einfluss auf die genomische Aktivität des MR hat. Der Einfluss des NaCl sollte sowohl unter MR-Aktivierung durch Aldosteron als auch unter Hydrokortison ermittelt werden, um Hinweise zur Veri- bzw. Falsifizierung der beiden Theorien zur Erklärung der MR-Aktivierung in einem pathophysiologischem Milieu zu erhalten.

Den nächsten Verwandten des MR stellt der GR dar. Beide Kortikosteroidrezeptoren binden an das gleiche HRE induzieren aber *in vivo* gegensätzliche Effekte. Der MR kann pathophysiologische Wirkungen (Vaskulopathie, Fibrose, Inflammation) vermitteln, wohingegen der antiinflammatorisch wirkende GR einen möglichen Antagonisten dieser MR-Wirkungen darstellt [198]. Vergleichend sollte daher der Einfluss einer erhöhten extrazellulären NaCl-Konzentration auf die genomische Aktivität des GRs überprüft werden. Weiterführend sollte getestet werden, ob der Einfluss von NaCl auf die genomische MR-/GR-Aktivität durch eine Veränderung der Osmolalität entsteht (NaCl = Dissoziation in zwei osmotisch wirksame Teilchen). Dazu wurden stets Kontrollen mit äquimolaren Mannit-Konzentrationen anstatt NaCl mitgeführt.

Unter Ausnutzung des inhibitorischen Effektes von Ouabain auf die ATP1, sollte der Einfluss von erhöhten intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentrationen auf die genomische MR-/GR-Aktivität untersucht werden. Durch Aktivierung der Signaltransduktionsdomäne der ATP1 durch nanomolare Ouabainkonzentrationen sollte darüber hinaus überprüft werden, ob das dadurch veränderte Signaling einen Einfluss auf die genomische MR-/GR-Aktivität ausübt. Die Untersuchungen wurden in einem gut kontrollierbaren heterologen Expressionssystem - den HEK-293-Zellen - durchgeführt. Dieses Zellsystem wurde gewählt, da HEK-293-Zellen keinen MR exprimieren und somit die Möglichkeit bieten, zwischen MR- und GR-induzierten Effekten zu unterscheiden. In einem zweiten Schritt wurden ausgewählte Testbedingungen in einem differenzierteren Zellmodell – den A10 Zellen – wiederholt. Diese Zellen besitzen Eigenschaften von glatten Gefäßmuskelzellen und weisen mehr Gemeinsamkeiten mit den Geweben auf, welche im Rahmen einer pathologischen Aldosteron-MR-Aktivität geschädigt werden als HEK-293-Zellen. Dies sollte der Verifizierung der gefundenen Effekte dienen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tab. 1: Materialien

<b>BD Biosciences (San Jose, USA)</b> Falcon Multiwell 24 well 353047 Falcon tissue culture dishes Pure Coat Amine	<b>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</b> F16 Black Maxisorb
<b>Eppendorf (Hamburg, Deutschland)</b> Pipetten	<b>VWR (Pennsylvania, USA)</b> Pipetten
	<b>Whatman (Sanford, USA)</b> Nitrozellulosemembran Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran

#### 2.1.1 Chemikalien

Tab.2: Verwendete Chemikalien

<b>Amresco (Solon, USA)</b> Bisacrylamid	<b>Sigma (Deisenhofen, Deutschland)</b> Glukose
<b>Biomol (Hamburg, Deutschland)</b> Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Hepes
<b>Biorad (Hercules, USA)</b> Acrylamide Solution	$\beta$ -Mercaptoethanol
<b>Fluka (Oberhaching, Deutschland)</b> Ammonium-Peroxodisulfat (APS)	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
Hefe-Extrakt	Natriumchlorid
<b>Merck (Darmstadt, Deutschland)</b> Calciumchlorid-Dihydrat	Natriumhydrogencarbonat
Kaliumchlorid	Natriumorthovanadat
Kaliumdihydrogenphosphat	Natriumpyrophosphat
Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat	Nystatin
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Paraformaldehyd
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Poly-L-Lysin-Hydrobromid
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Protease-Inhibitor-Cocktail
Natriumhydroxid	Salzsäure
<b>Serva (Heidelberg, Deutschland)</b> Albumin Bovine Fraction V (BSA)	Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Ethidiumbromid	Thapsigargin
<b>Sigma (Deisenhofen, Deutschland)</b> 1,4-Diazobicyclo-2,2,2-octan (Dabco)	Triton X-100
Dimethyl-D6-Sulfoxid (DMSO)	Tris-Base
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)
Ethylene-glycol-bis-(2-aminoethyl)- N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)	Trypsin
	Tryptone
	Tween-20
	Wasser (Reinstwasser)
	<b>Roth (Karlsruhe, Deutschland)</b> Essigsäure
	Milchpulver

Tab.3: Zellkultur

<b>ATCC (Manassas, USA)</b> Humane embryonale Nierenzellen (HEK-293) <b>Clontech Laborat. (Mountain View, USA)</b> pGRE-SEAP-Plasmid <b>Deutsches Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland)</b> A10-Zellen	<b>Farman, Nicolette (Paris, Frankreich)</b> EGFP-hMR-Plasmid <b>Govindan, Manjapra (Quebec, Kanada)</b> pcDNA 1 GR <b>Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)</b> pcDNA3.1 His-LacZ-Plasmid <b>PAA (Pasching, Österreich)</b> DMEM Ham F12, DMEM low Glukose, MEM
---	---

Tab.4: spezielle Chemikalien und Kits

<b>BioCellChallenge (Paris, Frankreich)</b> GeneCellin™ <b>Biometra (Göttingen, Deutschland)</b> Immun Star Western C Kit <b>Invitex (Berlin, Deutschland)</b> Invitrap® Spin Tissue RNA Mini Kit Invisorb® Plasmid Maxi Kit <b>Invitrogen (Carlsbad, USA)</b> SuperScript One-Step-RT-PCR Kit <b>Molecular Probes (Leyden, Niederlande)</b> 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) Fura-2 AM SBFI AM <b>New England Biolab (Ipswich, USA)</b> DNase I	NeBuffer for DNase I <b>Peqlab (Erlangen, Deutschland)</b> DNA-Leiter dNTP 6x Ladepuffer Protein-Marker <b>Promega Corporation (Madison, USA)</b> Attophos Reagenz® <b>Qiagen (Hilden, Deutschland)</b> Effectene® und PolyFect® 10 x PCR Puffer Tag-DNA-Polymerase <b>Thermo Scientific (Rockland, USA)</b> ECL Western Blotting Substrate BCA-Reagenz A
---	---

## 2.1.2 Geräte

Tab.5: Geräte

<b>Agilent Technologies (Santa Clara, USA)</b> qRT-PCR: Stratagene MX 3005P <b>Biometra (Göttingen, Deutschland)</b> Blotter: Fastblot B44 Gelelektrophoresekammer: Minigel Twin Thermoblock: Uno-Thermoblock Thermocycler: TProfessional Basic Gradient UV-Transilluminator: Universal Hood II u. FLX-20M <b>BioSan (Riga, Lettland)</b> Bakterienschüttler: Environmental Shaker-Inkubator ES 20 <b>Biotec Fischer (Reiskirchen, Deutschland)</b> Transformator: Phero-Stab 550 <b>Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)</b> Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 100 TV Mikroskop, automatischer Filterwechsel von Hamamatsu (Herrsching, Deutschland) und 100W Xenonlampe	<b>General Electric (Fairfield, USA)</b> UV-Spektrometer: NanoVue <b>Heidolph (Schwabach, Deutschland)</b> Horizontalschüttler: Polymax 1040 <b>Keyence (Osaka, Japan)</b> Fluoreszenzmikroskop: BZ-8100E <b>Kojair (Vilppula, Finnland)</b> Sterilbank: Biowizard Silver Line <b>Peqlab (Erlangen, Deutschland)</b> Thermoshaker TS 100 <b>Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)</b> Waage: BL 1500s <b>Tecan (Männedorf, Schweiz)</b> Fluoreszenzspektrometer: Infinite® Photometer: Sunrise® <b>Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)</b> Brutschrank: Hera Cell 150 Wasserbad: Haake DC10-W18P Zentrifuge: Heraeus Fresco 17
---	--

<b>Faust (Köln, Deutschland)</b> Analysenwaage: FA-110-4i	<b>Tokai Hit (Shizuoka-Ken, Japan)</b> Inkubationskammer: ONIVF Kontrolleinheit: INU-F1 <b>Werner (Leverkusen, Deutschland)</b> Reinstwasseranlage: Easy pure
--	---

### 2.1.3 Verwendete Programme

Tab.6: Verwendete Programme und deren Entwickler

Programm	Entwickler
Aqua Cosmos 1.3	Hamamatsu (Herrsching, Deutschland)
BZ Analyzer	Keyence (Osaka, Japan)
End Note X1	Thomson Reuters (New York, USA)
i-control 1.7	Tecan (Männedorf, Schweiz)
MS Excel und -Word 2013	Microsoft (Redmont, USA)
Primer 3	<a href="http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm">http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm</a>
Quantity One 4.6.5	Biorad (Hercules, USA)
Sigma Plot 8.0	Systat Software (Erkrath, Deutschland)
Stratagene MxPro qRT-PCR Software	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien und deren Kultivierung/ Passagierung

Alle verwendeten Zelllinien (Tab.7) wurden in 10 cm Zellkulturschalen unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, feuchte Atmosphäre) in den angegebenen Medien kultiviert. Bei Konfluenz erfolgte zur Passagierung initial ein Waschschrift mit EDTA-Lösung (EDTA [0,7 mmol/l], NaCl [140 mmol/l], KCl [2,7 mmol/l], Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O [6,5 mmol/l], KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [1,5 mmol/l]) und danach die Ablösung der Zellen durch Trypsin (Trypsin [0,1%] (v/v) in EDTA-Lösung). Die Zugabe von serumhaltigem Medium beendete die Trypsinwirkung.

Tab.7: Informationen zu den verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Charakteristika	Spezies	Medium	Zusätze
HEK-293	embryonale Nierenzellen	heterologes Expressionssystem	Human	DMEM-Ham-F12	FCS 10% NaHCO <sub>3</sub> 10 mmol/l
A10	Aorta thoracica	Zelllinien mit VSMC-Charakter [199]	Ratte	DMEM low Glukose	FCS 20%

### 2.2.2 Einfrieren/ Auftauen von Zelllinien

Die Zellen wurden wie in Kap.2.2.2 trypsiniert, in 10 ml Standardmedium aufgenommen. und bei 385 x g für 2 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurden im jeweiligen, fetales Kälberserum-

(FCS) haltigen Standardmedium (Tab.7) resuspendiert und 1:1 mit Einfriermedium (85% FCS, 15% DMSO) versetzt. Die Abkühlung erfolgte um 1°C/min bis auf -80 °C, gefolgt von der Überführung in flüssigem Stickstoff.

Der Auftauprozess erfolgte im Wasserbad bei 40°C. Nach Überschreitung des Gefrierpunktes des Mediums wurde die Zellsuspension mit 10 ml des entsprechenden Standardmediums verdünnt und bei 385 x g für 2 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in vorgewärmten FCS-haltigem Medium resuspendiert und in eine im Brutschrank vorgewärmte und äquilibrierte Zellkulturflasche überführt.

### 2.2.3 Transiente Transfektion

Die Transfektion der HEK-293 erfolgte mit PolyFect® und die der A10 Zellen mit GeneCellin™ nach Herstellerangaben bei circa 80%iger Zellkonfluenz.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Die RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Invitrap® Spin Tissue RNA Mini Kit von Invitex. Nach der RNA-Quantifizierung mittels des UV-Spektrometers NanoVue wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Für die Reverse Transkription wurde das SuperScript One-Step-RT-PCT Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet (Tab.2).

Tab.8: Pipettierschema eines Ansatzes der reversen Transkription

Reagenz	Mastermix mit Reverser Transkriptase [µl]	Mastermix ohne Reverse Transkriptase [µl]
5x First Strand Buffer	4	4
DTT [0,1 mol/l]	0,25	0,25
dNTP [je1 mmol/l]	1	1
RNAse Out [40 U/µl]	0,5	0,5
Random Primer [0,03 µg/µl]	0,67	0,67
Superscript II Reverse Transkriptase	0,25	-
Template	7	7
Reinstwasser	11,33	11,58

### 2.3.2 Polymerasekettenreaktion und Primeretablierung

Die DNA-Amplifizierung verlief in den drei klassischen Reaktionen Denaturierung (94°C, 30 sec), Primer-Hybridisierung bei der spezifischen *annealing* Temperatur (30 sec; T<sub>A</sub>) und

DNA-Synthese (72°C, 1 min; Pipettierschema Tab.9). Alle verwendeten Primer (Tab.10) stammten von Eurofins (Ebersberg, Deutschland) und wurden auf Grundlage der vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) stammenden Gensequenzen mittels Primer 3 vom NCBI intronüberspannend generiert.

Tab.9: Pipettierschema eines PCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
10 x PCR Puffer	2,5
dNTPs [10 mmol/l]	0,6
sense Primer [10 $\mu$ mol/l]	1
antisense Primer [10 $\mu$ mol/l]	1
Taq-DNA-Polymerase	0,25
Wasser	17,65
cDNA	2

Tab.10: PCR- und qRT-PCR-Primer und deren Eigenschaften

Genname	Primersequenz (5'-3')	Spezies
Mineralokortikoid Rezeptor	5'GGT CAA CCC ATT TCC ATT CA-3' 5'AAG CCT CAT CTC CAC ACA CC-3'	Ratte
Mineralokortikoid Rezeptor	5'-ATG GGT ATC CGG TCT TAG AAT AC-3' 5'-CTC AAG GCA AAT GAT GAT AGA CA-3'	Human
$\beta$ -Aktin	5'-TGA CGG TCA GGT CAT CAC TAT C-3' 5'-GGC ATA GAG GTC TTT ACG GAT G-3'	Ratte / Human
Serum- und Glukokortikoid induzierbare Kinase 1	5'-AGG CTT TCC TAG GCT TTT CCT A-3' 5'-TGA GGA GAA TGT GCT CTT CAA A-3'	Human

### 2.3.3 Quantitative real time PCR

Die qPCR wurde mittels des MX 3005P *cyclers* mit folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung (95°C für 5 min) und 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C für 30 sec), Annealing (Annealingtemperatur des Primers für 45 sec) und Elongation (72°C für 30 sec). Den Abschluss bildete die Schmelzkurve (95°C für 1min, 52°C für 45sec und 95°C für 30 sec). Stets wurden Dreifachbestimmungen angesetzt, das Ergebnis gemittelt und  $\beta$ -Aktin als Kontrollgen eingesetzt. Die Auswertung erfolgte anhand der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode.

Tab.11: Pipettierschema eines qPCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
SYBR-Green® Supermix (Invitrogen)	6,25
Primer (sense; [10 $\mu$ mol/l])	0,5
Primer (antisense; [10 $\mu$ mol/l])	0,5
ROX	0,025
H <sub>2</sub> O	3,23
Template	2
Gesamtvolumen	12,5

### 2.3.4 DNA-Gelelektrophorese

In horizontalen Gelkammern in 1-2 % Agarosegelen (Agarose (w/v) in TAE-Lösung) und TAE-Lösung (Tris Base [0,02 mol/l], EDTA [100 mmol/l], Essigsäure [1,1 %]) als Laufpuffer erfolgte die Auftrennung bei 10 V/cm je Gel. 5 µl Probe und 1 µl 6 x Ladepuffer wurden eingesetzt sowie ein DNA-Größenstandard mitgeführt. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte nach 30 min schwenken in Ethidiumbromid-haltiger Lösung (0,5 µg/ml in H<sub>2</sub>O) und zweimaligem Waschen in Reinstwasser für je 30 min mittels Transilluminator bei 355 nm.

### 2.3.5 Plasmidgewinnung

Nach dem Auftauen von *Escherichia coli* Typ Top10F' (Invitrogen) wurden 10 µl Bakteriensuspension in 5 ml Luria-Bertani-Medium [Tryptone (10 g/l), Hefe-Extrakt (5 g/l), NaCl (10 g/l) in Reinstwasser bei pH 7] überführt und entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids mit Kanamycin (10 µl/ml) oder Ampicillin (60 mg/l) versetzt. Nach Vermehrung im Horizontalschüttler über Nacht bei 37°C erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA anhand des Protokolls von Invitex. Die DNA wurde in Reinstwasser gelöst und bei -20°C gelagert.

## 2.4 Funktionelle Analysen/ Assays

### 2.4.1 GRE-Reporter-Gen-Assay und β-Galaktosidase-Assay

Diese Assays wurden zur Messung der transkriptionellen MR- und GR-Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stimulantien genutzt. Das pGRE-SEAP-Plasmid enthält die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) stromabwärts unter Kontrolle von drei GRE-Konsensussequenzen, an die MR und GR in aktivierter Form binden und dadurch die SEAP-Expression stimulieren. Die SEAP wird von den Zellen in den Extrazellulärraum abgegeben und kann durch Zugabe des Attophos-Reagenz<sup>®</sup> über Entstehung eines fluoreszierenden Substrats gemessen werden. Zur Bestimmung der SEAP-Expression wurden je 60 µl Zellkulturmedium und SEAP-Puffer [L-Homoarginin (60 mmol/l), MgCl<sub>2</sub> (3 mmol/l), ZnCl<sub>2</sub> (0,2 mmol/l), Tris-HCl (100 mmol/l, pH 9,3)] gemischt und für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl AttoPhos<sup>®</sup> Reagenz (0,5 mmol/l) wurde das entstehende Fluoreszenzsignal nach Anregung mit 440 nm und einer Emission von 560 nm für eine Stunde alle 70 sec gemessen.

Zur Normierung der Transfektionseffizienz und Zellzahl wurde die SEAP-Expression durch die β-Galaktosidase- (LacZ) Aktivität normiert. Hierfür wurden die Zellen mittels MOPS-Puffer (3-N-Morpholinopropansulfonsäure [20 mmol/l], Triton-X-100 [0,1 %] bei pH 7,4) lysiert, für 30

min bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (10 min, 13.845 x g). Für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden 50  $\mu$ l *cleavage* Puffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  [0,38 M],  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [0,06 M], KCl [0,1 M],  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [0,01 M] in  $\text{H}_2\text{O}$ ), 10  $\mu$ l (HEK-293) bzw. 20  $\mu$ l (A10 Zellen) Zelllysat und 20  $\mu$ l ONPG verwendet und bei 37°C für 30 min (HEK-293) bzw. 4 h (A10 Zellen) inkubiert. Durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat [1 mmol/l] wurde die Reaktion gestoppt und die Extinktion bei 420 nm gemessen. Dann wurde die spezifische GRE-SEAP-Aktivität berechnet (Abb. 5a).

a)	
1.	GRE-SEAP-Aktivität = Gesamt-SEAP-Aktivität - Hintergrundrauschen der GRE-SEAP Aktivität
2.	$\beta$ -Galactosidase Aktivität = Gesamt $\beta$ -Galactosidase Aktivität - Hintergrundrauschen der $\beta$ -Galactosidase Aktivität
3.	Spezifische GRE-SEAP Aktivität = $\frac{\text{GRE-SEAP-Aktivität}}{\beta\text{-Galactosidase Aktivität}}$
b)	
	Modulation der GSA = $\frac{(\text{GSA Modulator} + \text{Kortikosteroid}) / \text{GSA Modulator} - 1}{(\text{GSA Kortikosteroid}) / \text{GSA Kontrolle} - 1}$
	Induktion der GSA = $\frac{(\text{GSA Kortikosteroid})}{(\text{GSA Kontrolle})}$

Abb. 5: Berechnung der spezifischen GRE-SEAP-Aktivität (a) sowie der Modulation und Induktion aus der GSA (b)

Da sich im Folgenden ausschließlich auf die spezifische GRE-SEAP-Aktivität bezogen wird, wird dieses unter dem Begriff GRE-SEAP-Aktivität (GSA) beschrieben.

Der teils signifikante Eigeneffekt von NaCl bzw. Mannit im Vergleich zur Kontrolle, verzerrte den Vergleich von Hormon ohne NaCl bzw. Mannit versus Hormon mit NaCl bzw. Mannit auf Grundlage der GSA. Um die Eigeneffekte von NaCl bzw. Mannit berücksichtigen zu können, wurde die Modulation der genomischen MR-/ GR-Aktivität berechnet (Abb. 5b). Modulationswerte < 1 zeigen eine Inhibierung-, Modulationswerte = 1 zeigen keine Veränderung- und Modulationswerte > 1 eine Steigerung der Kortikosteroid-induzierten Rezeptoraktivität durch den Modulator an. Mithilfe der Modulation war es auch möglich Ergebnisse unterschiedlicher experimenteller Bedingungen direkt miteinander zu vergleichen.

Kam es unter Kortikoidsteroidgabe zu keiner signifikanten Stimulation der GSA über Kontrollniveau kam, wurde die Induktion berechnet (Abb. 5b).

### 2.4.2 Intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ - und $\text{Na}^{+}$ -Konzentrationsmessungen

Die Messung der intrazellulären Ionenkonzentrationsveränderungen erfolgte fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung zweier *dual excitation* Indikatoren, des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Fura-2 AM (Fura-2-acetoxymethylester) Farbstoffes und des  $\text{Na}^{+}$ -sensitiven SBFI AM

(sodium binding benzofuran isophthalate acetoxymethyl ester) Farbstoffes im *single ratio imaging* Verfahren. Für die Durchführung dieser Experimente wurden HEK-293 auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) beschichteten Deckgläschen angesät und für weitere 24 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit dem entsprechenden Farbstoff im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und im serumfreien Medium beladen (2 / 5 µmol/l Indikatorkonzentration und 15 / 60 min. Inkubationszeit für Fura-2 AM / SBF1 AM).

Alle 5 Sekunden wurden die mit Farbstoff beladenen Zellen mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt, das Fluoreszenzsignal bei 510 nm detektiert und der Quotient  $\text{Fluoreszenz}_{340\text{nm}}/\text{Fluoreszenz}_{380\text{nm}}$  (= Ratio 340/380 nm) berechnet.

Die Zellen deren Ca<sup>2+</sup>- bzw. Na<sup>+</sup>-Veränderungen gemessen werden sollten, wurden mit steril filtriertem, 37°C warmen Hepes-Ringer überströmt (NaCl [122,5 mmol/l], KCl [5,4 mmol/l], MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O [0,8 mmol/l], CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O [1,2 mmol/l], NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O [1 mmol/l], Glukose [5,5 mmol/l], Hepes [10 mmol/l], pH 7,4 bei 37°C), markiert und deren Hintergrundfluoreszenz bestimmt (Abb. 6).

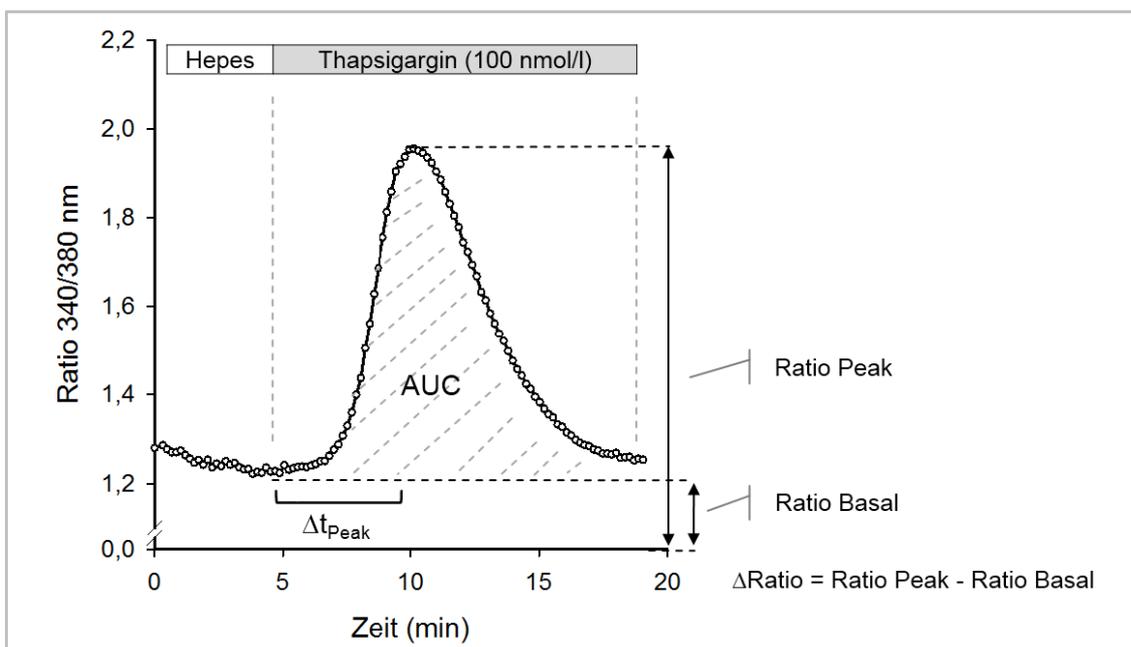


Abb. 6: Originalregistrierung einer Fura-2-Messung zur schematischen Verdeutlichung der Ca<sup>2+</sup>-/Na<sup>+</sup>-Auswertung.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe einer im Hepes-Ringer gelösten Testsubstanz. Wurde ein Ratioanstieg beobachtet, welcher absolut größer als die Summe des Mittelwerts des Ruheniveaus (*Ratio Basal*) und dem vierfachen der Standardabweichung des Ruheniveaus war, wurde dies als *Ratio Peak* definiert. Als Maß für die Veränderung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-/Na<sup>+</sup>-Konzentration wurde die Differenz aus Ratio Peak und Ratio Basal, die  $\Delta\text{Ratio}$ ,

berechnet. Ferner wurde die Zeitspanne von Beginn der Testsubstanzzugabe bis zum *Ratio Peak* als  $\Delta t_{\text{Peak}}$  gemessen. Zusätzlich erfolgte in einigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC), im Zeitfenster der Stimulation, abzüglich des Ruhenniveaus. Dies diente als Surrogat für die Menge an endoplasmatisch gespeichertem und freigesetztem Calcium. Den Abschluss der Messung bildete eine Positivkontrolle. Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen erfolgte dies mit Thapsigargin (100 nmol/l), bei den  $\text{Na}^{+}$ -Messungen mit Nystatin (100  $\mu\text{mol/l}$ ). Die Messungen erfolgten an einem Axiovert 100 TV Mikroskop.

## 2.5 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.5.1 Immunfluoreszenz

Transfizierte Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete 10-Loch Objektträger angesät, nach 24 h in serumfreiem Medium ruhiggestellt und am folgenden Tag stimuliert. Dann erfolgte die Fixierung durch 4 % Paraformaldehyd (15 min), dreimaliges waschen mit PBS (je 5 min) und die Permeabilisierung mittels MOPS-/Triton-Lysepuffer (Morpholinopropasulfonsäure [20 mmol/l], Triton X-100 [0,1%], pH 7,4). Die Zellkernfärbung erfolgte mit 1  $\mu\text{g/ml}$  4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 2 min. Nach dreimaligem waschen mit PBS (je 5 min) wurde der Objektträger in 2,5  $\mu\text{l}$  *mounting* Medium (Dabco) eingebettet und bei 4°C gelagert. Es wurde ein inverses Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop (Keyence) benutzt.

### 2.5.2 In vivo Imaging

Zur optischen Verifizierung des korrekten nukleären Transportes des verwendeten EGFP-hMR Konstruktes nach Kortikosteroidaktivierung, wurden Zellen wie für die Immunfluoreszenz angesät und ruhiggestellt. Mithilfe der Inkubationskammer von Tokai Hit für das inverse Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop konnten die Zellen auch außerhalb des Brutschranks kultiviert und unter Stimulation beobachtet werden.

## 2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.1 Proteinlysatherstellung

Die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml Pelletpuffer (PBS mit EDTA [1 mmol/l], Natrium-Orthovanadat [1 mmol/l], Protease-Inhibitor-Cocktail [1:500], pH 7,4) aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 385 x g, 4°C). Danach, wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 100  $\mu\text{l}$  CST-Puffer (NaCl [150 mmol/l], Triton X100 [1 %], Protease-

Inhibitor-Cocktail [1:500], EDTA [1 mmol/l], EGTA [1 mmol/l], Natriumorthovanadat [1 mmol/l], Natriumpyrophosphat [2,5 mmol/l], Tris-Base [20 mmol/l] mit pH 7,5 in H<sub>2</sub>O) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 3460 x g, 4 °C) wurde der Überstand überführt und bei -20°C gelagert.

### **2.6.2 Proteinquantifizierung**

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Zellextrakten erfolgte anhand der Bicinchinonsäure-Methode (BCA). Für die Proteinbestimmung wurden 5 µl Zellysate mit 300 µl eines Gemisches aus 50 Teilen BCA-Reagenz A und einem Teil BCA-Reagenz B (4%ige Kupfer(II)-sulfat-Lösung) versehen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zuletzt erfolgte die Absorptionsmessung (560 nm), wobei stets eine Eichkurve mit BSA (0, 100, 300, 500, 700 mg/l) mitgeführt wurde.

### **2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Gleiche Proteinmengen wurden 1:1 mit Redmix (SDS [10 %], 2-Mercaptoethanol [5%], Glycerol [1,2 mmol/l], Bromphenolblau [0,01 %], Tris-HCl [0,5 M], pH 6,8) gemischt und denaturiert (90 °C für 10 min). Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte im Sammelgel (3 %) bei 0,17 mA/cm<sup>2</sup> und anschließend im Trenngel (8 %) bei 0,33 mA/cm<sup>2</sup> in Laufpuffer (Tris-Base [25 mmol/l], Glyzin [192 mmol/l], SDS [0,1 %]; Tab.12). Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein Proteinmarker mitgeführt.

Mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren erfolgte der Western Blot auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran in Transferpuffer (Tris-Base [25 mmol/l], Glycin [192 mmol/l], Methanol [20 % (v/v)] in H<sub>2</sub>O) bei 2 mA/cm<sup>2</sup> für 1,5 h. Nun wurde die Membran in TBS-Puffer (Tris-HCl [17 mmol/l], Tris-Base [3 mmol/l], NaCl [14 mmol/l], HCl zur pH-Einstellung auf pH 7,6) gewaschen und für eine h in Blockierlösung (Tween-20 [0,1%] (v/v), Milchpulver [5%] in TBS-Puffer) geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen in TBS/Tween (Tween-20 [0,1 %] in PBS) für 5 min, erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tween-20 [0,1 %], BSA [5%] in PBS; Tab.13) über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde erneut dreimal in TBS/Tween für 5 min gewaschen und danach für zwei h mit den Meerrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert (Tab.13). Vor der Detektion mittels Chemilumineszenz am Universal Hood II von Biometra, wurden die Membranen dreimal für 5 min in TBS-Puffer und im Anschluss einmal in Reinstwasser gewaschen. Als Detektionsreagenzien wurden das ECL-Reagenz von Thermo Fischer Scientific und das

Immun Star Western C Kit von Biorad verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Quantity One®. Als Beladungskontrolle fungierte HSP90.

Tab.12: Gelzusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

	Sammelgel [ml]	Trenngel (8%; [ml])
<b>Acrylamide [40%]/ Bisacrylamid [2%] 1 : 0,54</b>	0,288	-
<b>Acrylamide [40%]/ Bisacrylamid [2%] 1 : 0,36</b>	-	1,715
<b>APS 10%</b>	0,03	0,075
<b>SDS 10%</b>	0,025	0,125
<b>Tris-HCl [0,5M] pH 6,8</b>	0,625	-
<b>Tris-HCl [1,5M] pH 8,8</b>	-	1,563
<b>TEMED</b>	0,01	0,02
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,54	2,713

Tab.13: Verwendete Antikörper für Western Blot und deren Verdünnung

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
rMR1-18 1D5	1:100	Gomez-Sanchez (Jackson, USA)
HSP 90α/β 8h-114): sc-7947	1:2000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
GFP (FL): sc-8334	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
GR (H-300): sc-8992	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
SGK1 <i>antibody</i> (ab43606)	1:5000	Abcam (Cambridge, UK)
<b>Sekundärantikörper</b>		
Anti-rabbit IgG	1:2000	Cell Signaling (Boston, USA)
Anti-rabbit-IgG	1:20000	Rockland (Gilbertsville, USA)
Anti-mouse IgG	1:2000	Cell Signaling (Boston, USA)

## 2.7 Statistik und Datenverarbeitung

Alle Ergebnisdaten wurden als arithmetischer Mittelwert mit *standard error of mean* (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen, homoskedastischen Students T-Test und Varianzanalyse (ANOVA) überprüft, wobei ein  $p \leq 0,05$  als signifikant (\*) und  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant (\*\*) angesehen wurde.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Modulation der MR-/ GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit in HEK-293

#### 3.1.1 MR-/ GR-Aktivierung

##### *Verifizierung des eingesetzten EGFP-MR-Plasmids*

Initial wurden die MR-Plasmide EGFP-MR und XPRESS-MR auf ihre Wirksamkeit im GRE-SEAP-Reporterassay getestet (Abb. 7a). Beide MR-Plasmide zeigten in vergleichbarem Maß eine durch Aldosteron stimulierte MR-Transaktivierungsaktivität, welche nicht durch alleinige Transfektion des Kontrollplasmids EGFP induziert werden konnte. Aufgrund der zusätzlichen fluoreszierenden Eigenschaften des EGFP-MR-Plasmids (hMR), wurden alle folgenden Versuche mit diesem Plasmid durchgeführt. Der Nachweis eines funktionell exprimierten EGFP-MRs erfolgte durch Immunfluoreszenz und *time lapse* Analysen nach Stimulation mit Aldosteron (Inkubationsdauer für die Immunfluoreszenz 24 h, für die *time laps* Aufnahmen 30 min). Hierbei konnte bei beiden Verfahren eine ligandenabhängige MR-Translokation aus dem Zytosol in den Nukleus nachgewiesen werden (Abb. 7b/c).

Im Folgenden ist mit MR-/ GR-Überexpression immer die Verwendung des EGFP-MR-/ HisB-GR-Plasmids gemeint. Alle Diagramme enthalten in der rechten oberen Ecke kleine Symbole, die die Rezeptorausstattung und Rezeptoraktivierung unter den jeweiligen Testbedingungen anzeigen. Rezeptorbezeichnungen ohne eckige Klammern (z.B. GR in Abb. 7a) zeigen endogen exprimierte- und in eckigen Klammern (z.B. [MR] in Abb. 7a) überexprimierte Rezeptoren an. Eine Rezeptoraktivierung durch die verwendeten Kortikosteroide wird durch fett gedruckte Schreibweise symbolisiert, nicht fettgedruckte Rezeptoren waren in den Zellen exprimiert, unter den getesteten Bedingungen jedoch nicht aktiviert.

##### *Genomische MR-/ GR-Aktivität bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen*

Im nächsten Schritt wurde das Antwortverhalten des überexprimierten MR und -GR auf unterschiedliche Ligandenkonzentrationen untersucht, wobei bei der genomischen GR-Aktivität zwischen endogenem GR und HisB-GR-Überexpression (hGR) unterschieden wurde (Abb. 8b). Die hGR-Überexpression ermöglichte eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der hMR-Überexpression.

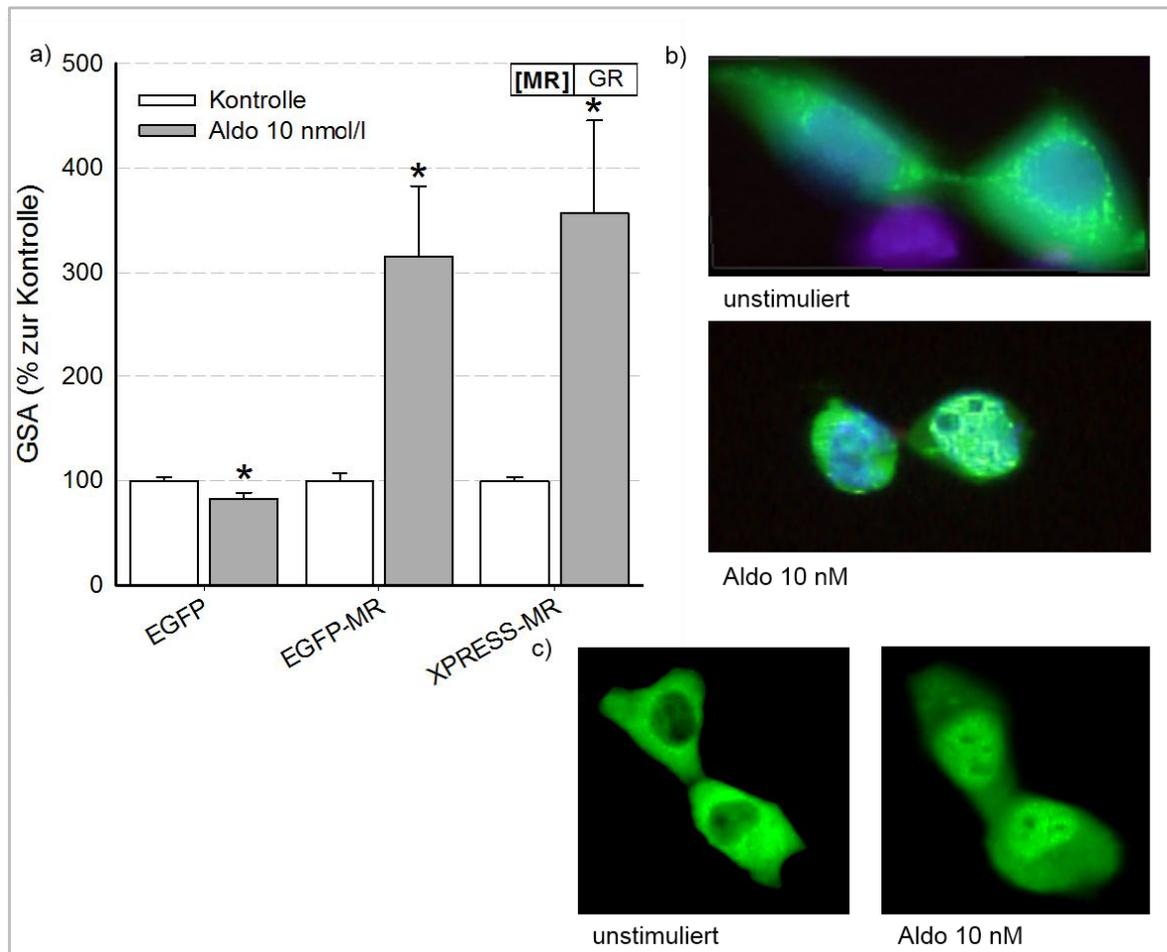


Abb. 7: Verifizierung der Funktionsfähigkeit des verwendeten MR Plasmids

- Vergleich der Aldosteron-induzierten GSA durch die Konstrukte EGFP, EGFP-MR und XPRESS-MR in HEK-293 bei deren Überexpression (MW ± SEM; N ≥ 3; \*p ≤ 0,05; vs. Kontrolle)
- Immunfluoreszenz von HEK-293 ohne Stimulation des zytosolischen, grün fluoreszierenden EGFP-MR und mittels DAPI blau fluoreszierenden Nukleus (oben), sowie nach 24 h Stimulation mit Aldosteron mit EGFP-MR-Nachweis im blauen Nukleus (unten)
- Time laps* Aufnahmen mit regelrechter Translokation des EGFP-MR Plasmides unter Aldosteroneinfluss aus dem Zytoplasma in den Zellkern in HEK-293 (dieselben Zellen vor- und 17 Minuten nach Aldosteronapplikation)

Eine signifikante Induktion der GR-Transaktivierungsaktivität wurde durch Hydrokortison Konzentrationen  $\geq 100$  nmol/l erreicht. Diese Aktivierungsschwelle war unabhängig von der hGR-Überexpression. Unterschiede zeigten sich im  $\mu\text{mol/l}$  Konzentrationsbereich von Hydrokortison, wo die zusätzliche hGR-Überexpression zu einer gesteigerten GR-Aktivität führte. Auch im Sättigungsverhalten zeigten sich Abweichungen. Wurde beim endogenen GR bereits bei 1  $\mu\text{mol/l}$  Hydrokortison die maximale Rezeptoraktivität erreicht, deutete sich bei zusätzlicher hGR-Überexpression bis zu einer Hydrokortisonkonzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  kein Sättigungsplateau an. Ferner ließ sich bei zusätzlicher hGR-Überexpression eine Rechts-

verschiebung der  $EC_{50}$  von 0,15  $\mu\text{mol/l}$ - (endogener GR allein) auf 1,13  $\mu\text{mol/l}$  Hydrokortison (endogener GR + hGR) beobachten (gestrichelte Linien in Abb. 8b).

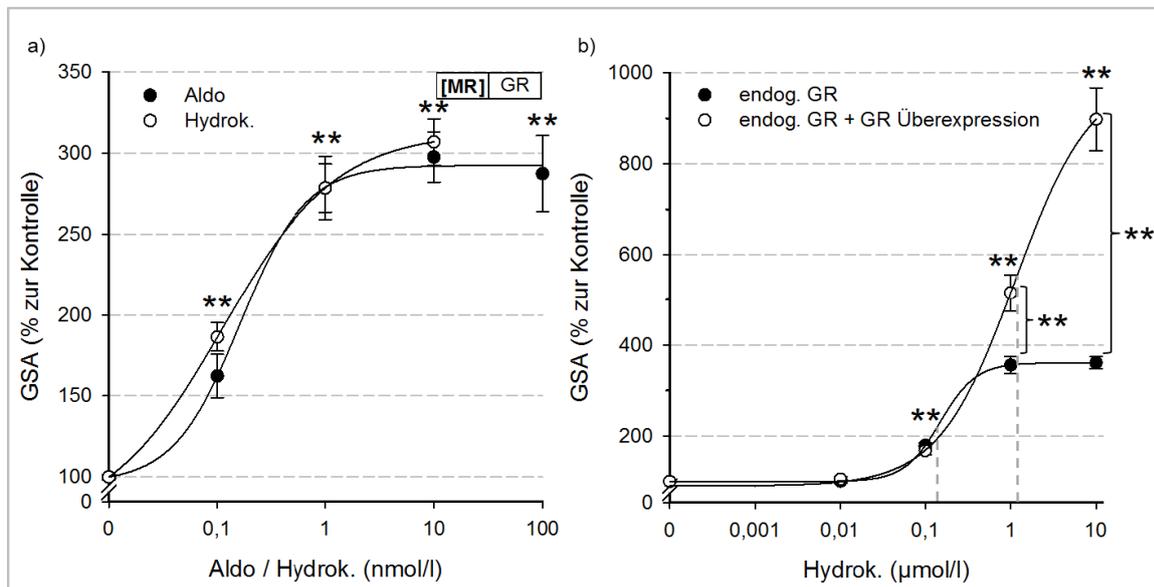


Abb. 8: MR- und GR-Aktivierung durch Aldosteron/Hydrokortison in HEK-293  
 a) MR-Aktivierung durch Aldosteron und Hydrokortison in HEK-293 mit hMR-Überexpression (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*\*p  $\leq$  0,01; vs. Kontrolle)  
 b) Modulation der GSA durch unterschiedliche Hydrokortisonkonzentrationen in HEK-293 mit/ohne hGR-Überexpression; gestrichelte Linien entsprechen den  $EC_{50}$ -Werten des endogenen GR und des endogenen GR mit zusätzlicher hGR-Überexpression (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*\*p  $\leq$  0,01; vs. Kontrolle)

Die Transaktivierungsaktivität des hMRs wird bereits durch subnanomolare Aldosteron- und Hydrokortisonkonzentrationen stimuliert (Abb. 8.a). Da diese Hydrokortisonkonzentrationen (bis 10 nmol/l) nicht ausreichen um den endogenen- sowie überexprimierten GR zu aktivieren, kann sicher von einer hMR-induzierten GSA ausgegangen werden. Alle durch diese Hydrokortisonkonzentration induzierten Effekte, wurden daher im Folgenden dem MR und nicht dem GR zugeordnet. Bezüglich der  $EC_{50}$ -Werte des hMRs für Aldosteron und Hydrokortison fanden sich keine relevanten Unterschiede (0,16 nmol/l für Aldosteron vs. 0,11 nmol/l für Hydrokortison), was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt [200, 201]. Ebenfalls unabhängig vom gewählten Liganden erwiesen sich die maximale hMR-Aktivität und das Sättigungsverhaltens der MR-Transaktivierungsaktivität (bei beiden zwischen 1 - 10 nmol/l).

#### Modulation der hMR-/ hGR-Proteinexpression durch Aldosteron/ Hydrokortison

Der Einfluss von unterschiedlichen Stimulationsbedingungen auf die MR-/ GR-Proteinexpression wurde durch Western Blot Analyse (WB) untersucht. Damit sollte

untersucht werden, ob die gemessene, ligandenabhängige-GSA vom MR bzw. GR auch von einer quantitativ veränderten Proteinexpression der Rezeptoren abhängt.

Es fanden sich Banden erwarteter Größe für hMR (131 kDa) und hGR (95 kDa) und keine quantitative Modulation der Proteinexpression des hMRs durch Aldosteron bzw. des hGRs durch Hydrokortison (Abb. 9). Nach Aktivierung des MR mit Aldosteron fand sich eine verbreiterte MR-Bande (Abb. 9a), welche typischerweise durch posttranslationale MR-Modifikationen unter Aldosteroneinfluss auftritt. Auch unter NaCl-Einfluss konnte keine veränderte MR-/ GR-Proteinexpression nach 24 h (und 48 h am MR) in den HEK-293 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass jede Modulation der Rezeptoraktivität durch eine Veränderung von dessen Aktivität hervorgerufen wurde.

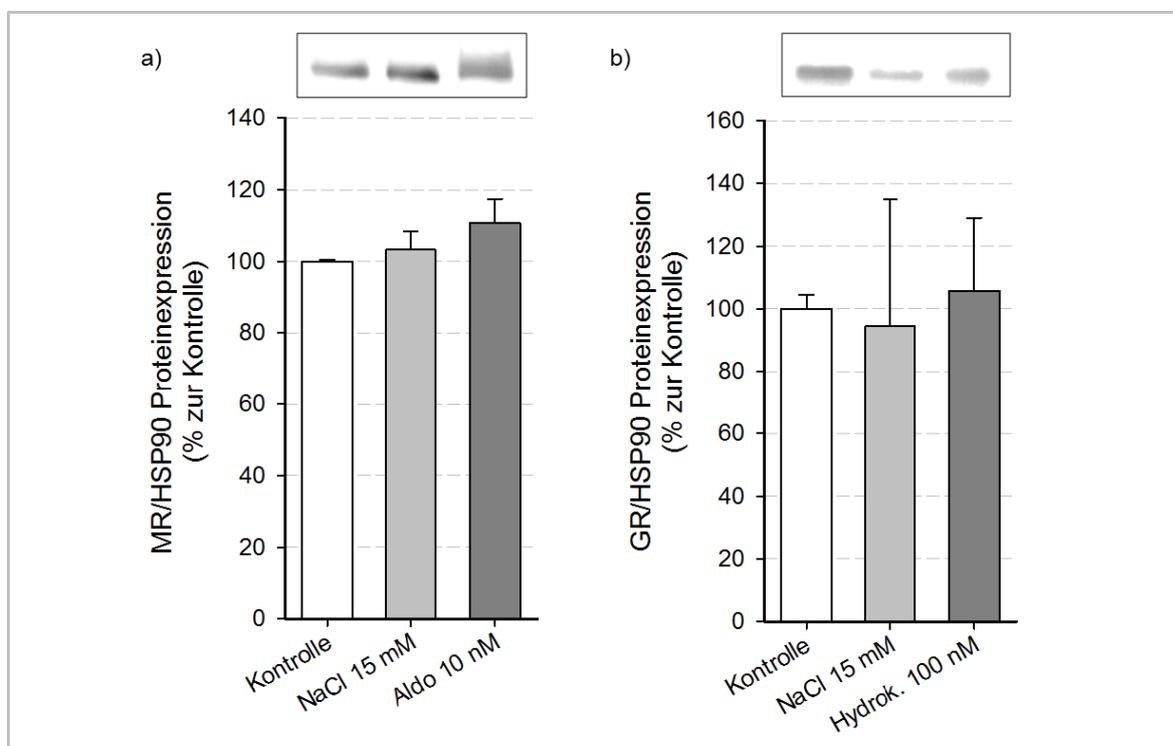


Abb. 9: Einfluss der MR-/ GR-Liganden auf deren Proteinexpression in HEK-293  
 a) Einfluss von Aldosteron und NaCl auf die hMR-Proteinexpression (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Kontrolle)  
 b) Einfluss von Hydrokortison und NaCl auf die hGR-Proteinexpression (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Kontrolle)

### 3.1.2 Modulation der Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten MR-Aktivität durch NaCl/ Mannit

Nach der Charakterisierung der experimentellen Bedingungen wurde der Einfluss von NaCl und äquimolaren Mannit auf die ligandenabhängige hMR-Aktivität untersucht. Dazu wurden

neben Aldosteron ausschließlich solche Hydrokortisonkonzentrationen verwendet, bei denen der endogene GR der HEK-293 nicht aktiviert wurde (bis 10 nmol/l). Beide Substanzen zeigten bei 24 h Inkubationsdauer keinen relevanten Eigeneffekt (Abb. 10a).

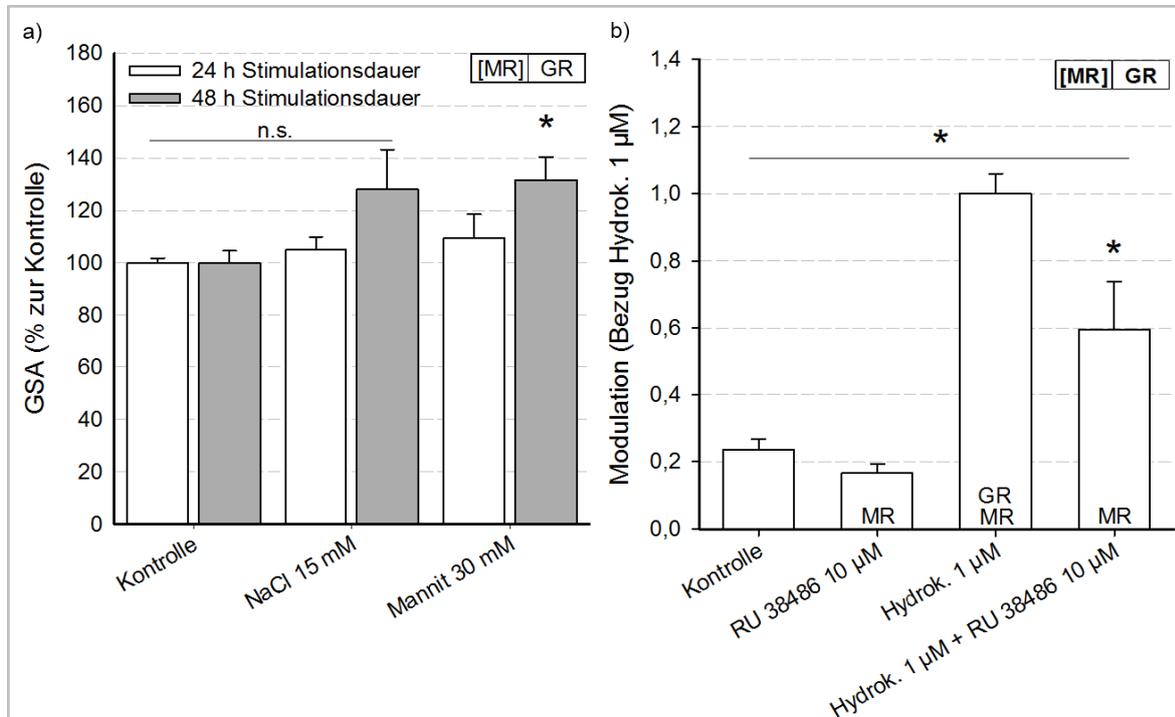


Abb. 10 a) Modulation der GRE-SEAP-Grundaktivität durch NaCl und Mannit bei unterschiedlicher Stimulationsdauer in HEK-293 mit transient transfiziertem hMR (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*P  $\leq$  0,05; vs. jeweilige Kontrolle)  
 b) Differenzierung zwischen hMR- und endogener GR-Aktivität durch den GR-Inhibitor RU 38486 unter Rezeptorstimulation mit Hydrokortison (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05; vs. Hydrokortison 1 µmol/l)

Die zusätzliche NaCl-Behandlung (15 mmol/l) führte nur bei Aldosteron-/ Hydrokortisonkonzentrationen von 10 nmol/l zu einer Steigerung der maximalen MR-Aktivität (Abb. 11 a/b). Um zwischen einen NaCl-spezifischen und osmolalitätsbedingten Einfluss unterscheiden zu können, wurden im Vergleich zu NaCl identische Messbedingungen mit äquimolaren Mannit getestet. Hierbei zeigte sich ebenfalls nur bei einer Aldosteron-/ Hydrokortisonkonzentration von 10 nmol/l ein modulierender Effekt (Abb. 12 a/b). Somit ergab sich ein geringer stimulierender, osmolalitätsabhängiger Effekt auf die maximale hMR-Rezeptoraktivität unabhängig vom eingesetzten Liganden.

In weiterführenden Versuchen wurden die MR-transfizierten HEK-293 für 24 h mit NaCl (15 mmol/l) bzw. Mannit (30 mmol/l) vorinkubiert und anschließend für weitere 24 h mit NaCl bzw. Mannit und Kortikosteroiden (10 nmol/l) behandelt. Die Ligandeninkubationsdauer von Aldosteron und Hydrokortison blieb somit unverändert bei 24 h. Aufgrund eines signifikant

stimulierenden Eigeneffekts von Mannit (Abb. 10a), konnten die GSA Werte nicht mit denen des NaCl miteinander verglichen werden (Abb. 13a/b).

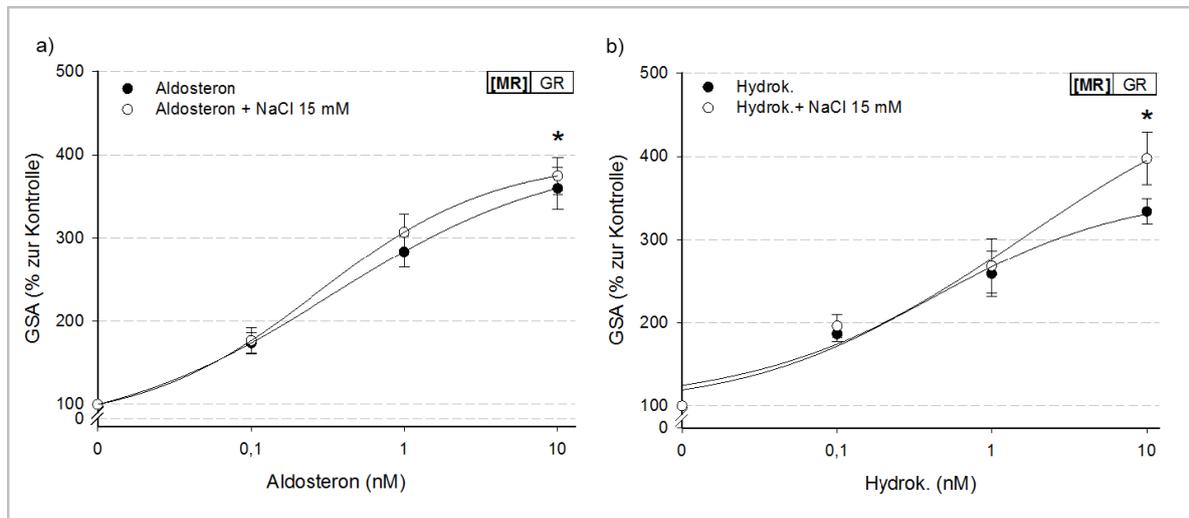


Abb. 11: Einfluss von NaCl auf die durch Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierte MR-Aktivität in transient transfizierten MR HEK-293 nach 24 h

- Modulation der Aldosteron-induzierten GSA durch NaCl 15 mmol/l (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  5; \*p  $\leq$  0,05; vs. Kontrolle)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA durch NaCl 15 mmol/l (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05; vs. Kontrolle)

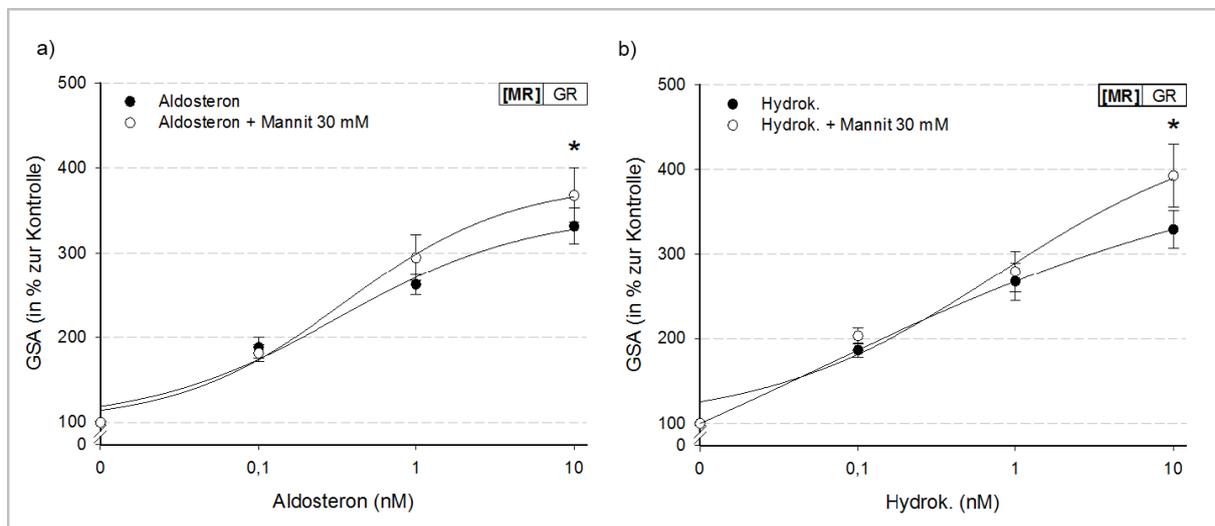


Abb. 12: Einfluss von Mannit auf die Aldosteron-/Hydrokortison-induzierte MR-Aktivität in transient transfizierten MR HEK-293 nach 24 h

- Modulation der Aldosteron-induzierten GSA durch Mannit 30 mmol/l (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05; vs. Kontrolle)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA durch Mannit 30 mmol/l (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05; vs. Kontrolle)

Zur Beurteilung der Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten Rezeptoraktivierung unter Manniteinfluss wurde die Modulation berechnet um die Gesamtrezeptoraktivität um den

stimulierenden Eigeneffekt des Mannits zu korrigieren. Für die direkte Vergleichbarkeit wurde dies auch für die NaCl-Daten berechnet (Abb. 13c/d). Der positiv modulierende Effekt des NaCl auf die durch 10 nmol/l Aldosteron induzierte hMR-Aktivität stieg durch die Verdopplung der NaCl-Inkubationsdauer um den Faktor 4 (von  $1,17 \pm 0,1$  (24 h) auf  $1,7 \pm 0,2$  (48 h); Abb. 13c). Bei Stimulation mit Hydrokortison war der positiv modulierende NaCl-Effekt mit einem Faktor von 2,5 kleiner, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  (von  $1,22 \pm 0,12$  (24 h) auf  $1,54 \pm 0,31$  (48 h); Abb. 13d). Mannit hingegen hatte nach 48 h Behandlung unter Aldosteron-/ Hydrokortison-Einfluss und Berücksichtigung des Eigeneffektes keinen modulierenden Effekt (Abb. 13c/d).

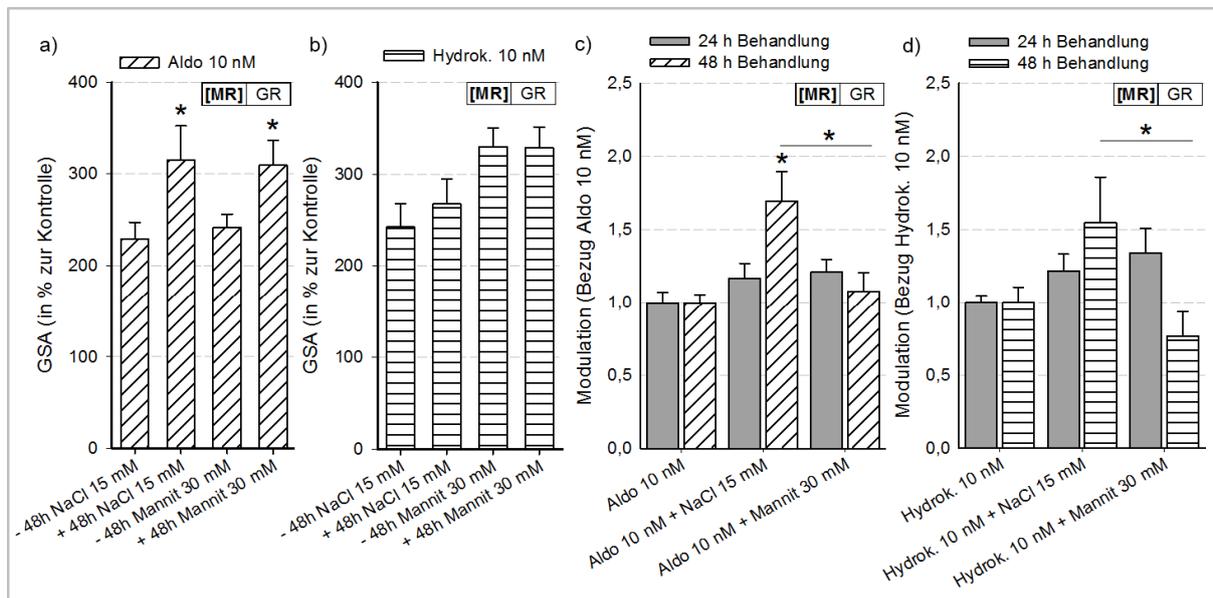


Abb. 13: Zeitabhängigkeit des modulierenden Einflusses von NaCl bzw. Mannit auf die Aldosteron- / Hydrokortison-induzierte MR-Aktivität in transient transfizierten MR HEK-293 nach 24- und 48 h

- Modulation der Aldosteron-induzierten GSA am MR durch 48 h Inkubationsdauer mit NaCl 15 mmol/l oder Mannit 30 mmol/l; Gesamtrezeptoraktivität ohne Berücksichtigung des stimulierenden Mannit-Eigeneffekts (MW  $\pm$  SEM; N = 3; \* $p \leq 0,05$ ; vs. Kontrolle)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA am MR durch 48 h Inkubationsdauer mit NaCl 15 mmol/l oder Mannit 30 mmol/l; Gesamtrezeptoraktivität ohne Berücksichtigung des stimulierenden Mannit Eigeneffekts (MW  $\pm$  SEM; N = 3)
- Zeitabhängigkeit des Einflusses von NaCl bzw. Mannit auf die Aldosteron-induzierte GSA nach 24- und 48 h; Aldosteron-abhängige Rezeptoraktivierung nach Korrektur für den stimulierenden Eigeneffekt der 48 h Mannitbehandlung (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \* $p \leq 0,05$ ; vs. Aldosteron 10 nmol/l.)
- Zeitabhängigkeit des Einflusses von NaCl bzw. Mannit auf die Hydrokortison-induzierte GSA nach 24- und 48 h; Hydrokortison-abhängige Rezeptoraktivierung nach Korrektur für den stimulierenden Eigeneffekt der 48 h Mannitbehandlung (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \* $p \leq 0,05$ ; vs. Hydrokortison 10 nmol/l.)

### 3.1.3 Modulation der Hydrokortison-induzierten GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit

#### *Modulation der Transaktivierungsaktivität des hGR durch NaCl/Mannit*

In vergleichenden Untersuchungen wurde der Einfluss von NaCl bzw. Mannit auf den GR untersucht. Weder NaCl noch Mannit zeigten einen relevanten Eigeneffekt auf die genomische hGR-Aktivität (Abb. 15a). Bei hGR-Überexpression zeigte sich im Hydrokortisonkonzentrationsbereich von 10 nmol/l bis 10 µmol/l eine stimulierende NaCl-Wirkung auf die genomische hGR-Aktivität (Abb. 14a).

Der Austausch des NaCl gegen äquimolaren Mannit führte zu einer vergleichbaren Stimulation im nmol/l Hydrokortisonkonzentrationsbereich. Jedoch ließ sich die unter NaCl-Einfluss abgebildete Steigerung der maximalen Rezeptoraktivität mit Mannit nicht reproduzieren (Abb. 14b). Insgesamt ist daher von einer NaCl-abhängigen ( $v_{max}$ ) und Osmolalitäts-abhängigen ( $K_M$ ) Modulation der hGR-Aktivität auszugehen.

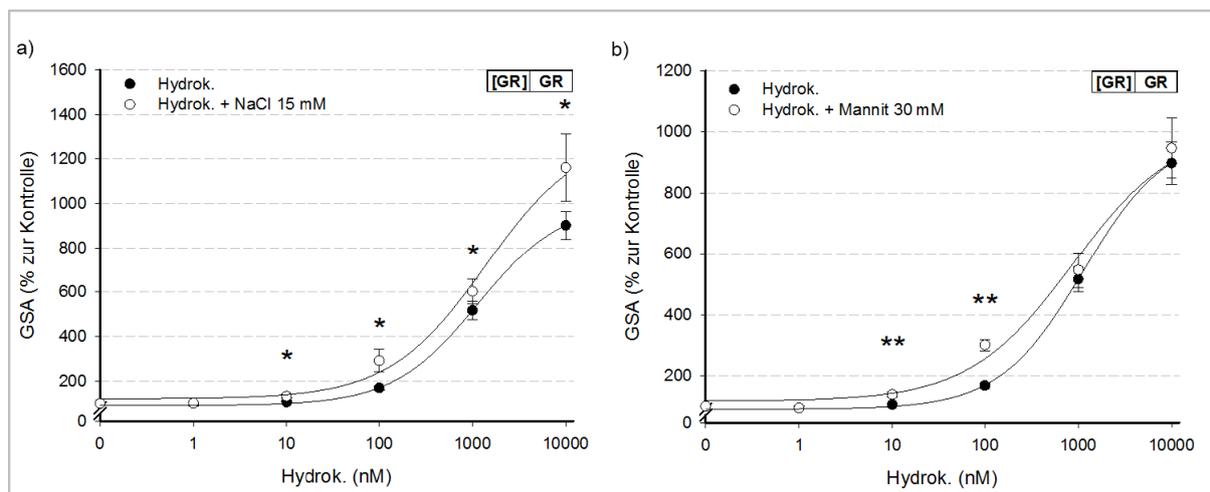


Abb. 14: Modulation der hGR-Aktivität durch NaCl bzw. Mannit, in HEK-293 mit hGR-Überexpression

- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA durch NaCl (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05 vs. Kontrolle)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA durch äquimolaren Mannit (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*\*p  $\leq$  0,01 vs. Kontrolle)

#### *Modulation der Transaktivierungsaktivität des endogenen GR durch NaCl/Mannit*

Da sich endogener GR + hGR-Überexpression vs. endogener GR allein bei der Hydrokortison-induzierten maximalen GR-Aktivität unterscheiden (Abb. 8b), wurde auch die NaCl-abhängige Modulation der GR-Aktivität für den endogenen GR allein untersucht.

Im Gegensatz zur hGR-Überexpression zeigten NaCl und Mannit einen signifikant stimulierenden Einfluss auf die endogene GR-Grundaktivität (Abb. 15a).

Zur Beurteilung der Hydrokortison-induzierten Rezeptoraktivierung unter NaCl- bzw. Manniteinfluss wurde die Modulation berechnet um die Gesamtrezeptoraktivität um den stimulierenden Eigeneffekt von NaCl und Mannit zu korrigieren. Im Gegensatz zur stimulierenden Wirkung des NaCl und Mannit bei hGR-Überexpression fand sich beim endogenen GR keine Modulation der GR-Aktivität durch diese Substanzen (Abb. 15b).

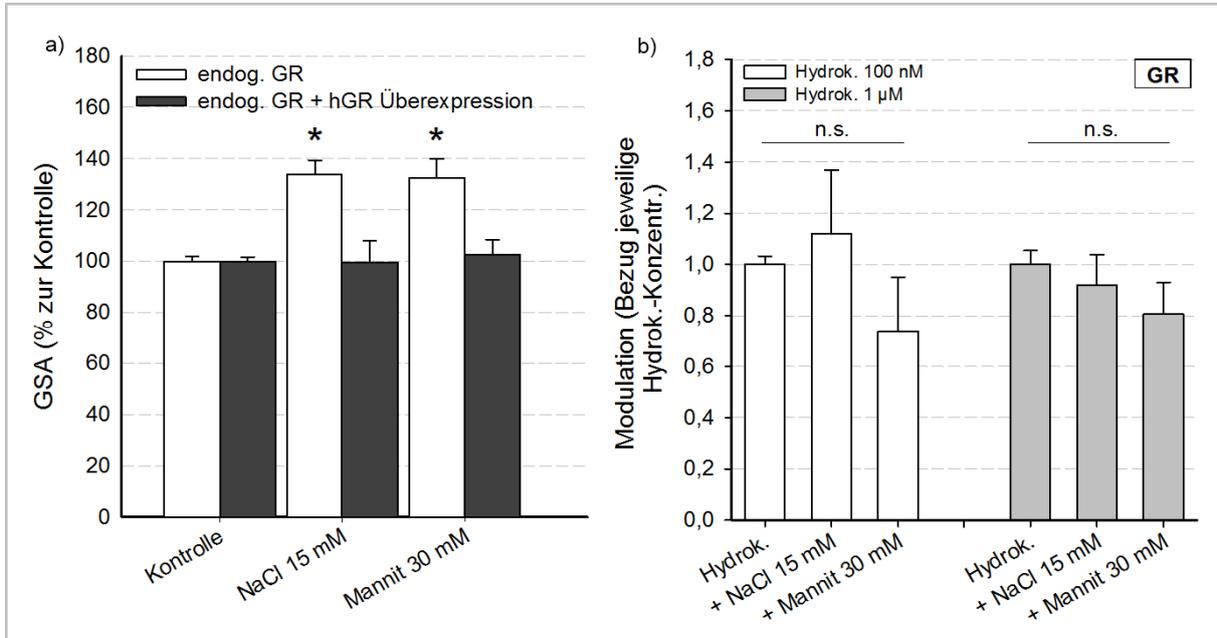


Abb. 15: Einfluss von NaCl und Mannit auf die endogene GR-Aktivität in HEK-293

- Vergleich des Einfluss von NaCl und Mannit auf die Grundaktivität des endogenen GR vs. Kombination von endogenem GR und hGR-Überexpression (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05; vs. Kontrolle)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten endogenen GR-Aktivität durch NaCl bzw. Mannit; Hydrokortison-induzierte Rezeptoraktivierung unter Berücksichtigung der stimulierenden Eigeneffekte von NaCl und Mannit (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Kontrolle)

### 3.1.4 MR-GR-Interaktion

In den bisherigen experimentellen Bedingungen wurden MR oder GR einzeln untersucht, wohingegen im physiologischen Kontext stets beide Rezeptoren vorkommen und aktiv sind. Dies sollte ebenfalls berücksichtigt werden. Mittels 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison wurden unter hMR-Überexpression MR und GR aktiviert und NaCl sowie Mannit hinzugegeben. In gepaarten Experimenten wurde unter denselben Bedingungen der endogene GR pharmakologisch mittels RU 38486 gehemmt und die GSA miteinander verglichen. Der Inhibitor besitzt keinen Eigeneffekt und zeigt bei hMR-Überexpression und Stimulation mit 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison sowohl eine MR-Aktivierung (signifikanter Unterschied zur Kontrolle) als auch eine Aktivierung des endogenen GR (signifikanter Unterschied zu Hydrokortison allein) an (Abb. 10b).

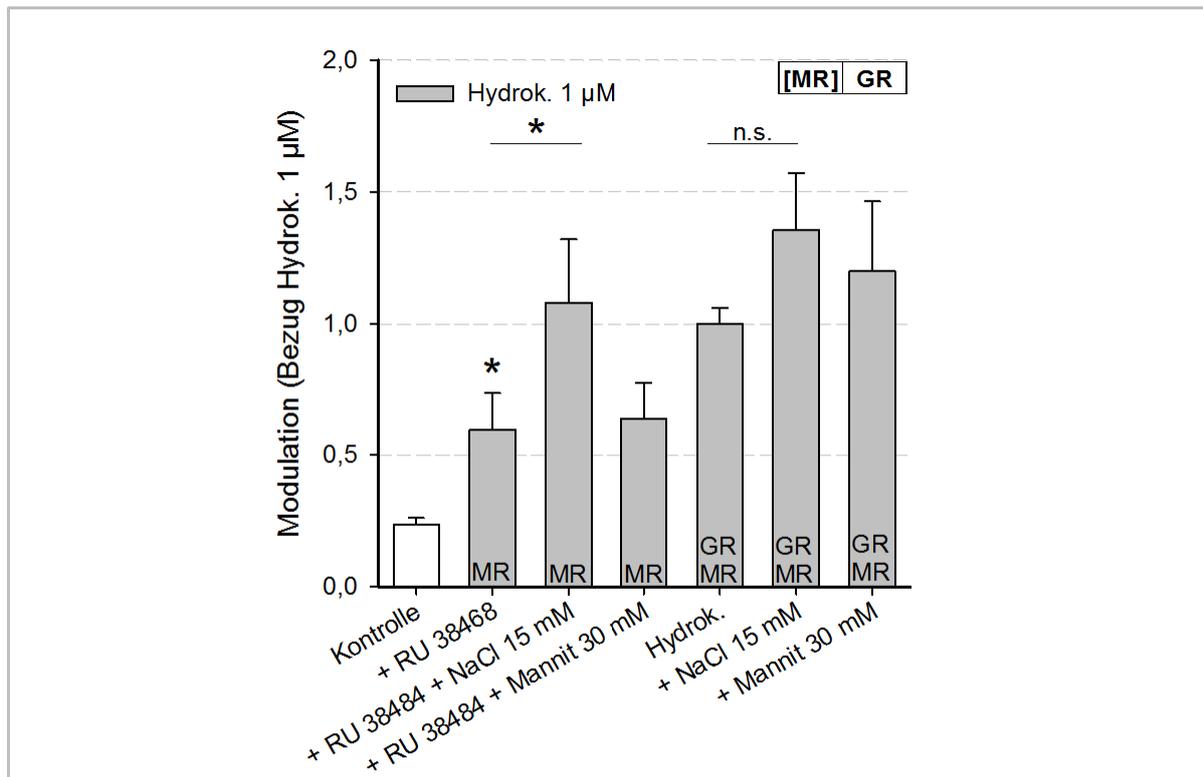


Abb. 16: Vergleich der modulierenden NaCl-/Mannit-Wirkung bei gleichzeitiger hMR- und endogener GR-Aktivierung vs. hMR-Aktivierung allein; Aktivierung mittels 1 µmol/l Hydrokortison, GR-Blockade durch GR-Inhibitor RU 38486 (10 µmol/l) in HEK-293 mit hMR-Überexpression; Positiv modulierender NaCl-Effekt am MR, welcher sich bei gleichzeitiger Aktivierung von MR und endogenem GR nicht mehr nachweisen lässt (Modulation ± SEM; N ≥ 3; \*p ≤ 0,05; vs. Hydrokortison 1 µmol/l)

Waren beide Rezeptoren aktiv, zeigte sich keine modulierende NaCl- bzw. Mannit-Wirkung am GRE Reporter. Wurde der endogene GR mittels RU 38486 gehemmt, so fand sich für den MR eine stimulierend modulierende Wirkung für NaCl, aber nicht für Mannit (Abb. 16). Dies verifiziert eine stimulierende, osmolalitätsunabhängige Wirkung des NaCl am hMR nach 24 h Inkubationsdauer. Das Fehlen des hMR vermittelten NaCl-Effektes bei gleichzeitiger hMR- und endogener GR-Aktivierung kann als Hinweis für eine MR-GR-Interaktion gewertet werden, in welcher dem GR eine hemmende Funktion zukommen würde. Da die absolut unveränderte NaCl-Wirkung bei gleichzeitiger Aktivierung von endogenem GR und hMR gemessen an der Gesamtrezeptoraktivität deutlich kleiner ist als bei alleiniger hMR-Aktivierung, ist auch ein rein statistischer Effekt möglich.

### 3.1.5 Modulation der SGK-1-Expression

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1 (SGK-1) ist ein typisches MR- und GR-induzierbares Protein [46, 57, 202]. Damit stellte es einen idealen Kandidaten zur

funktionellen Verifizierung der in HEK-293 nachgewiesenen modulierenden NaCl-Effekte dar. Da bisher keine Daten über eine Expression der SGK-1 in HEK-293 vorliegen, wurde zunächst die SGK-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen (Abb. 17). Im Anschluss war es jedoch nicht möglich mit Glukokortikoid-haltigem Medium (durch FCS-Zusatz) eine Stimulation der mRNA-Expression nachzuweisen (Abb. 17a). Auf Proteinebene ließ sich ebenso keine Modulation der SGK-1-Expression durch Aldosteron oder Hydrokortison nach 6- und 24 h Stimulation nachweisen (Abb. 17b; Daten für 6 h nicht gezeigt). Mögliche Erklärungen hierfür sind zeitlich unter den verwendeten Inkubationszeiten liegende Regulationsmechanismen oder eine nicht Kortikosteroid regulierte SGK-1 in diesem Zellsystem.

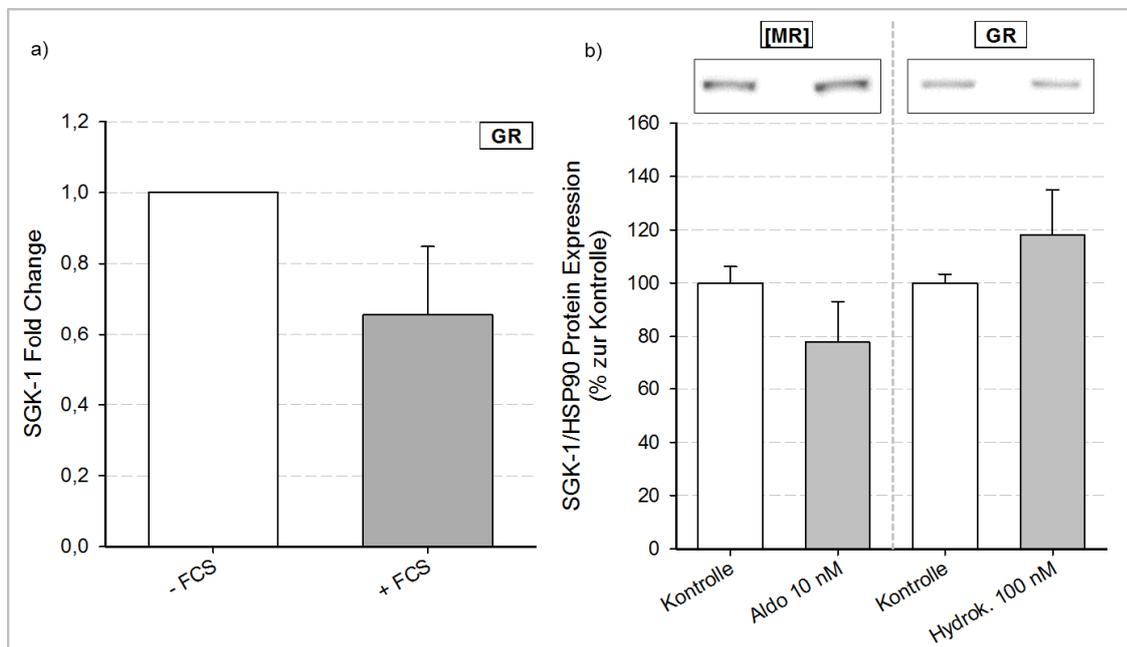


Abb. 17: Nachweis der SGK-1-Expression auf mRNA- und Proteinebene in HEK-293 und Einfluss von Kortikosteroiden auf deren mRNA-/ Protein-Expression

- Einfluss von kortikosteroidhaltigem FCS-Medium auf die SGK-1-mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in HEK-293 ohne hMR-Überexpression (MW  $\pm$  SEM; N = 3; vs. Kontrolle)
- Einfluss von Aldosteron/ Hydrokortison auf die SGK-1-Proteinexpression nach 24 h in hMR- (links) und hGR- (rechts) überexprimierenden HEK-293 (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Kontrolle)

### 3.2 Modulation der MR-/ GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit in A10 Zellen

Zur Verifikation der biologischen Relevanz der erhobenen Ergebnisse aus dem HEK-293-Zellsystem wurden die Kernaussagen in einem differenzierteren Zellmodell überprüft.

Ausgewählt wurden die A10 Zellen, welche der thorakalen Aorta embryonaler Ratten entstammen und ein etabliertes VSMC Modell darstellen. Diese Zellen wurden gewählt, da das Gefäßsystem und speziell VSMC im Rahmen eines vaskulären Entzündungs- und Remodelingprozesses eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von MR-induzierten Schäden spielen [46, 155, 156, 158, 163, 203].

### 3.2.1 MR-/ GR-Aktivierung

#### *Endogener MR und -GR in A10 Zellen*

Zunächst erfolgte der Nachweis einer endogenen MR-Expression sowohl auf mRNA-Ebene, mittels Intron-überspannender Primer, als auch auf Proteinebene (Abb. 18 a/d). Um im Anschluss die Aktivierbarkeit des MR durch Aldosteron und Hydrokortison im GRE-SEAP-Assay zu messen, wurde ein neues Transfektionsprotokoll für diese Zelllinie etabliert (GeneCellin).

Unerwarteter Weise ließ sich der endogene MR der A10 Zellen nicht durch Aldosteron aktivieren (bis 100 nmol/l; Abb. 18b). Hydrokortison hingegen führte zu einer deutlichen Steigerung der Induktion (Abb. 18c). Wurde der endogene GR mit RU 38486 gehemmt, zeigte sich jedoch, dass diese Aktivität bereits bei 10 nmol/l Hydrokortison ausschließlich durch den endogenen GR und nicht den endogenen MR vermittelt war (kein signifikanter Unterschied der Induktion nach GR Hemmung im Vergleich zur Kontrolle; Abb. 18 c). Im Vergleich zu den HEK-293 waren damit nicht nur das MR-Verhalten (geringere Aldosteron- und Hydrokortisonaffinität), sondern auch das endogene GR-Verhalten (erhöhte Hydrokortisonaffinität) in dieser Zelllinie unterschiedlich. Ein weiteres Indiz dafür war der hemmende Eigeneffekt des RU 38486 in A10 Zellen, welcher sich nicht in HEK-293 fand (Abb. 10b). Dies kann im Sinne einer gesteigerten Grundaktivität des endogenen GR in den A10 Zellen gedeutet werden, die durch RU 38486 gehemmt wird.

#### *Untersuchung des hMR in A10 Zellen*

Da der endogene MR der A10 Zellen keine Reaktion auf Aldosteron zeigte, erfolgte die transiente Transfektion des EGFP-MR (hMR). Auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene erfolgte der MR-Nachweis (Abb. 18a/e).

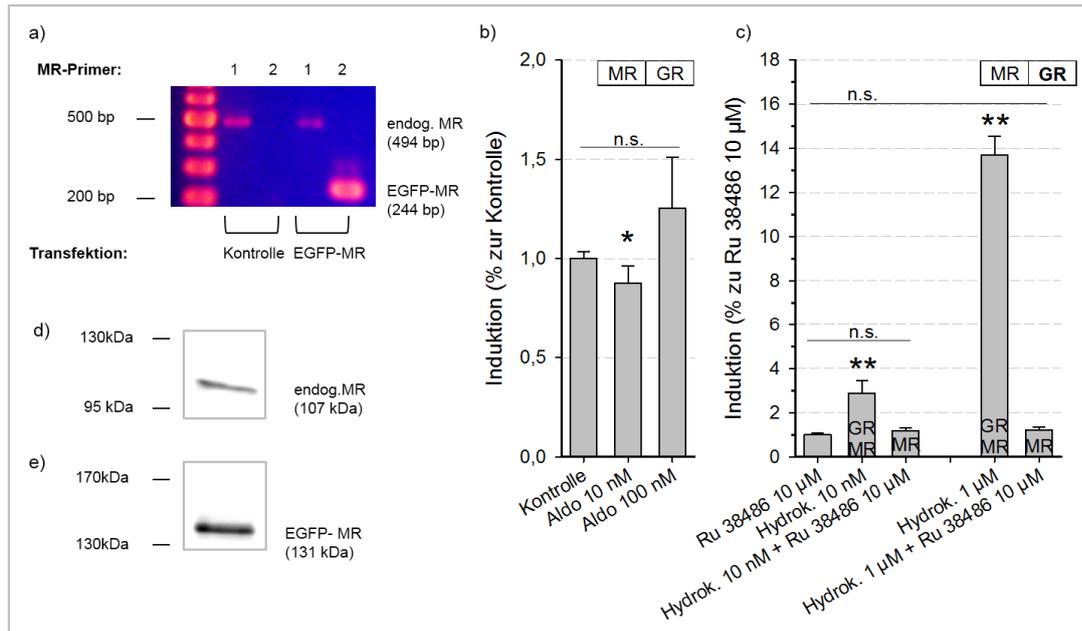


Abb. 18: Nachweis des endogenen- und überexprimierten MR- und der endogenen MR-/ GR-Aktivierung durch Aldosteron bzw. Hydrokortison in A10 Zellen ohne Rezeptorüberexpression

- Nachweis der mRNA-Expression vom endogenen- und transient transfizierten EGFP-MR in A10 Zellen; Primerpaar 1 = für endogenen MR; Primerpaar 2 = für EGFP-MR
- Vergleich der Aldosteron-induzierten Rezeptoraktivität (Induktion  $\pm$  SEM;  $N \geq 3$ ; \* $p \leq 0,05$ ; vs. Kontrolle)
- Vergleich der Hydrokortison-induzierten Rezeptoraktivität und Demaskierung alleiniger MR- bzw. GR-Effekte unter Verwendung des GR-Inhibitors RU 38486 (Induktion  $\pm$  SEM;  $N \geq 3$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; vs. RU 38486 10  $\mu\text{mol/l}$ )
- Nachweis der endogenen MR-Proteinexpression
- Nachweis der EGFP-MR-Proteinexpression

Transient mit hMR transfizierte A10 Zellen reagierten bereits auf 10 nmol/l Aldosteron (Abb. 19a). Ferner konnte mittels MR- und GR-Inhibitoren gezeigt werden, dass der hMR in diesem Zellsystem auch durch Hydrokortison aktiviert wird. Wurde Hydrokortison gleichzeitig mit dem GR-Inhibitor RU 38486 verabreicht, so verblieb eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Modulation der GSA, welche der MR-induzierten Reporteraktivität entspricht (Abb. 19b). Da die vorherigen Versuche keine Aktivierung des endogenen MR durch diese Hydrokortisonkonzentration zeigten (Abb. 18c), wurde diese Modulation der GSA durch eine hMR-Aktivierung induziert. Wurde beide MR mit RU 28318 inhibiert zeigte sich zwischen Hydrokortison und Hydrokortison + RU 28318 ein mit  $p = 0,07$  fast signifikanter Modulationsunterschied (Abb. 19b), wobei die Differenz dieser beiden Modulationen der fehlenden hMR-Aktivität entspricht. Als MR-Inhibitor wurde RU 28318 anstatt Spironolacton genutzt, da letzterer in den A10- wie auch HEK-293 einen signifikant stimulierenden Eigeneffekt aufwies (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte die regelrechte Expression und Aktivierung des hMR durch Aldosteron und Hydrokortison in A10 Zellen nachgewiesen werden.

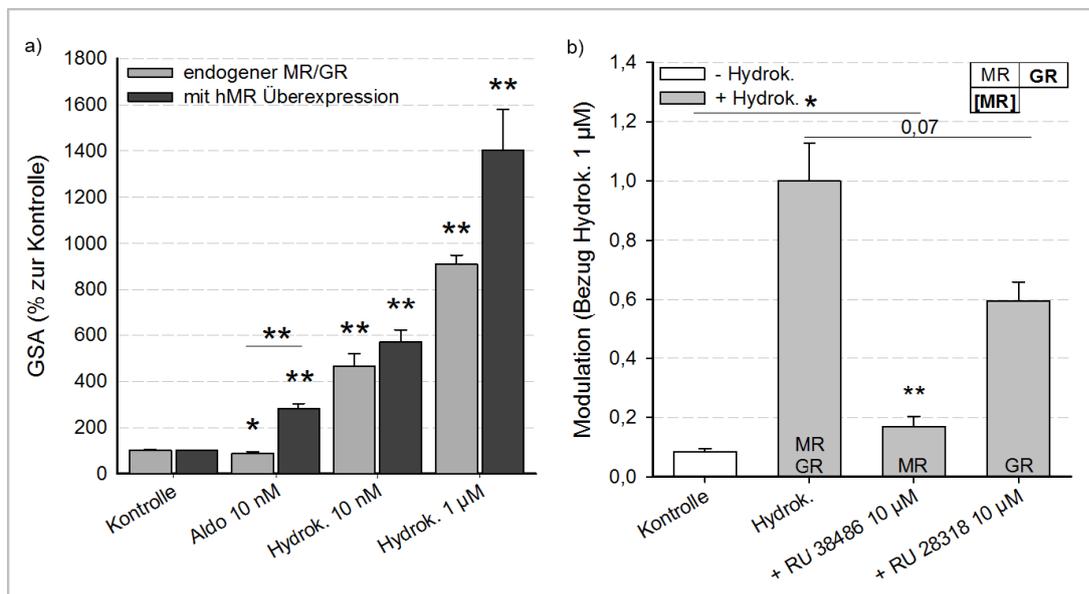


Abb. 19: Genomische hMR-Aktivität in A10 Zellen nach transienter Transfektion

a) Vergleich der Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten GSA mit/ohne EGFP-MR-Überexpression (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  4; \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; vs. Kontrolle)

b) Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA durch RU 38486 (GR-Inhibitor) und RU 28318 (MR-Inhibitor) (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; vs. Hydrokortison 1  $\mu$ mol/l)

#### Untersuchung des hGR in A10 Zellen

Aufgrund der Unterschiede zwischen endogenem GR und hGR die sich im HEK-293-Zellsystem zeigten, wurde auch in den A10 Zellen der hGR überexprimiert um ihn mit dem endogenen GR dieser Zellen vergleichen zu können. Hierbei zeigte sich, dass die durch 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison induzierte GR-Aktivität durch die zusätzliche hGR-Überexpression signifikant gesteigert wurde (wie auch in HEK-293; Abb. 20a). Somit kann von einer hGR-Aktivierung in diesem Zellsystem durch Hydrokortison ausgegangen werden.

#### Modulation der hMR-/ hGR-Proteinexpression durch Aldosteron und Hydrokortison

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse aus den GRE-SEAP-Assays durch eine MR-/ GR-Aktivierung und nicht durch eine verstärkte Expression der MR-/ GR-Proteinmengen resultieren, wurde dies erneut exemplarisch am endogenen MR und transfizierten hMR durchgeführt. Die Proteinexpression von Aldosteron-/ Hydrokortison-stimulierten A10 Zelllysaten wurde mittels WB densitometrisch analysiert. Hierbei zeigte sich für den endogenen MR keine Modulation der Proteinmenge durch Aldosteron oder Hydrokortison (Abb. 20b). Konkordant zu einer fehlenden Aktivierung des endogenen MR durch Aldosteron

in den Reporterassays (Kapitel 3.2.1) fand sich keine verbreiterte MR-Bande unter Aldosteroneinfluss als Zeichen einer Rezeptoraktivierung im WB (Abb. 20b). Die Expression des hMR zeigte keine Modulation durch Hydrokortison, doch ließ sich eine stimulierte hMR-Proteinexpression unter Aldosteron nachweisen (Abb. 20c). Ausgeprägte posttranslationale Modifizierungen des hMR unter Aldosteroneinfluss und die damit verbundenen Größenänderungen des MR Proteins, führten zu der typischen Größenzunahme der Bande des aktivierten hMR im Vergleich zur Kontrolle und Hydrokortison (Abb. 20c). Dies kann eine Zunahme der hMR-Proteinexpression unter Aldosteron vortäuschen.

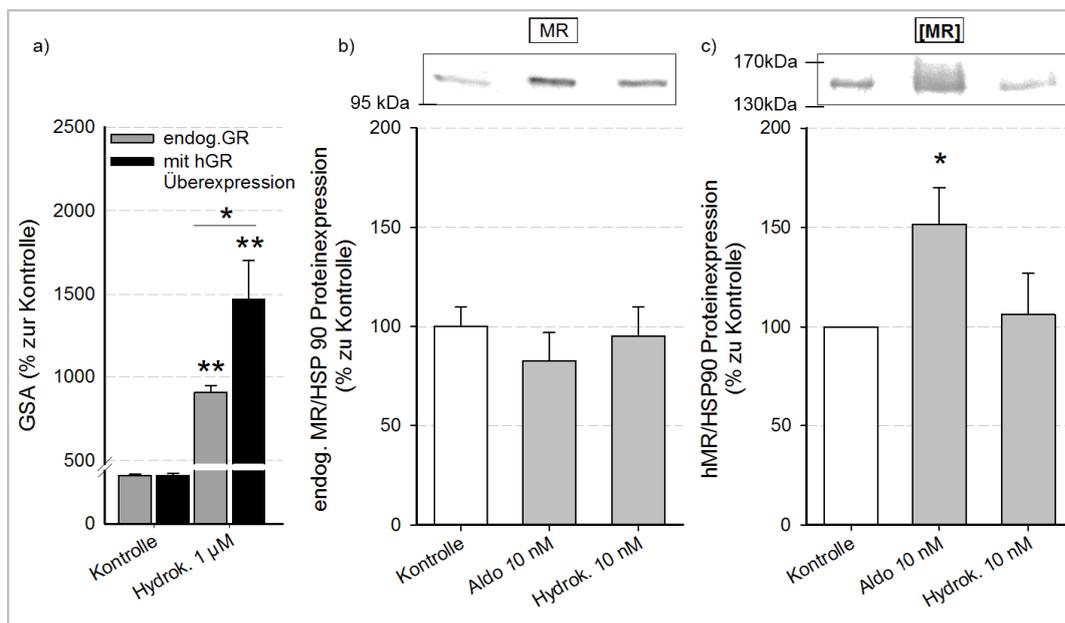


Abb. 20: Hydrokortison-induzierte GSA mit/ ohne hGR-Überexpression und Modulation der Proteinexpression von endogenem MR und hMR durch Aldosteron bzw. Hydrokortison in A10 Zellen

- Genomische GR-Aktivität in nicht transfizierten (endogener GR) und mit hGR transient transfizierten A10 Zellen (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  4; \*p  $\leq$  0,05; \*\*p  $\leq$  0,01; vs. Kontrolle)
- Modulation der Proteinexpression des endogenen MR durch Aldosteron/ Hydrokortison (MW  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Kontrolle)
- Modulation der hMR-Proteinexpression nach transienter Transfektion durch Aldosteron/ Hydrokortison in A10 (MW  $\pm$  SEM; n  $\geq$  4; \*p  $\leq$  0,05; vs. Kontrolle)

### 3.2.2 Modulation der Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten MR-Aktivität durch NaCl/ Mannit

Zunächst wurde überprüft ob sich durch zusätzliche NaCl-Behandlung der A10 Zellen eine Aldosteron-abhängige Aktivierung des endogenen MR erreichen lässt (mit Aldosteron/ Hydrokortison allein war dies nicht möglich). Da NaCl (24 und 48 h Behandlung) und Mannit einen signifikanten Eigeneffekt aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurde die Modulation

berechnet. Auch durch 24- und 48 h NaCl Stimulation ließ sich der endogene MR der A10 Zellen nicht durch Aldosteron aktivieren (Abb. 21a). Nach Inhibition des endogenen GR mittels RU 38486 und 24 h NaCl-Behandlung wurde der endogene MR ebenfalls nicht durch 1 µmol/l Hydrokortison aktiviert (Abb. 21b).

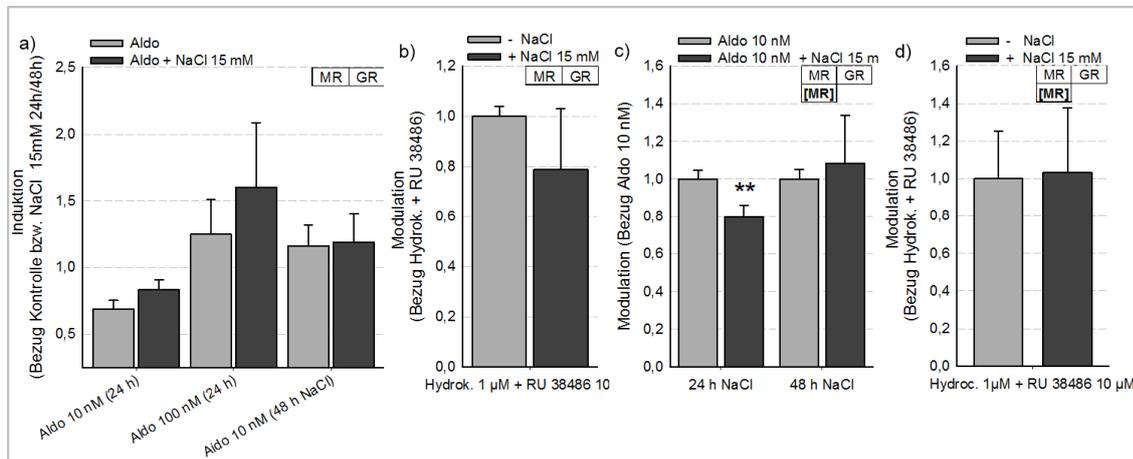


Abb. 21: Modulation der Aktivität des endogenen MR und hMR durch NaCl bzw. Mannit in A10 Zellen mit/ ohne hMR-Überexpression

- Modulation der Aldosteron-induzierten endogenen MR-Aktivität durch NaCl nach 24/48 h Behandlung ohne hMR-Überexpression (Induktion  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Kontrolle bzw. NaCl 15 mmol/l)
- Demaskierung der NaCl-abhängigen Modulation der Hydrokortison-induzierten endogenen MR-Aktivität mittels GR-Inhibition durch RU 38486 10 µmol/l ohne hMR-Überexpression (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Hydrokortison 1 µmol/l + RU 38486 10 µmol/l)
- Aldosteron-induzierte hMR-Aktivität unter Modulation von 24-/ 48 h NaCl bzw. 24 h Mannit Behandlung mit hMR-Überexpression (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Aldosteron 10 nmol/l)
- Demaskierung der NaCl-abhängigen Modulation der Hydrokortison-induzierten hMR-Aktivität mittels GR-Inhibition durch RU 38486 10 µmol/l mit hMR-Überexpression (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Hydrokortison 1 µmol/l + RU 38486 10 µmol/l)

Wurde der hMR in den A10 Zellen überexprimiert, änderte dies nichts an den NaCl-Eigeneffekten (Daten nicht gezeigt). Eine negative Modulation der Aldosteron-induzierten hMR-Aktivität durch NaCl fand sich nach 24 h Stimulation, wobei sich nach 48 h NaCl kein signifikanter Effekt mehr nachweisen ließ (Abb. 21c). Nach Hemmung des endogenen GR und Stimulation des hMR mit 1 µmol/l Hydrokortison zeigte sich ebenfalls kein modulierender Effekt für NaCl (Abb. 21d).

Zusammenfassend konnte somit weder für den endogenen MR noch für den hMR in den A10 Zellen eine positive Modulation der MR-Aktivität durch NaCl nachgewiesen werden.

### 3.2.3 Modulation der Hydrokortison-induzierten GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit

Auch beim GR wurde zunächst der endogene GR der A10 Zellen untersucht. Da die Vorversuche keine Aktivierung des endogenen MR durch 10 nmol/l und 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison zeigten (Abb. 18c), konnte unter diesen Bedingungen die Aktivität des endogenen GR gemessen werden, ohne dass der endogene MR gehemmt werden musste. Hier zeigte sich kein modulierender Effekt des NaCl am endogenen GR, sowohl nach 24- als auch 48 h NaCl-Behandlung (Abb. 22a). Diese Erkenntnisse konnten auch mittels MR-Inhibition durch RU 28318 bei 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison bestätigt werden (Abb. 22b).

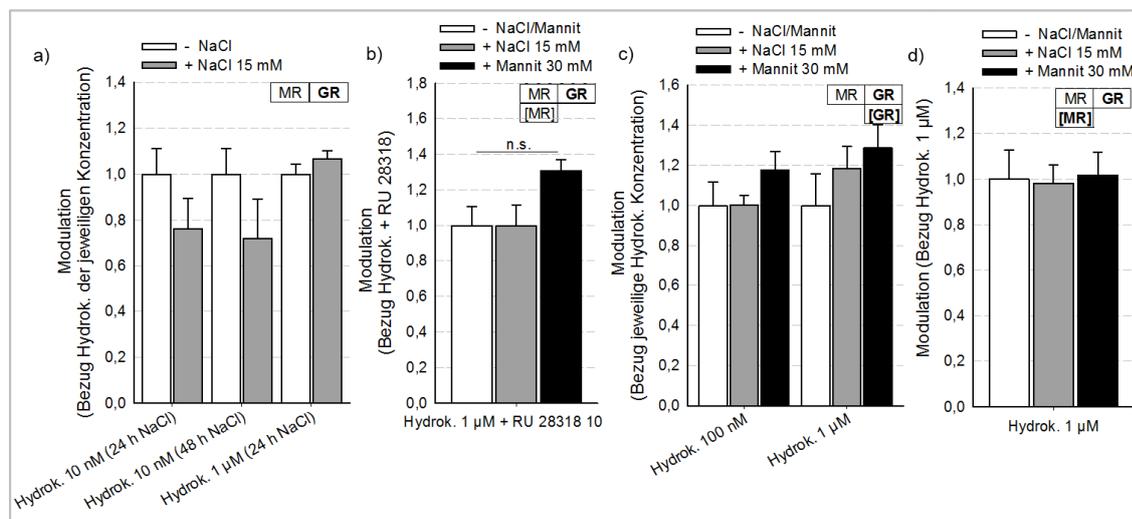


Abb. 22: Modulation der Rezeptoraktivität des endogenen GR (a-b) und hGR (c) durch NaCl/ Mannit, sowie modulierender NaCl-/ Mannit-Effekt bei gleichzeitiger Aktivierung von endogenem GR und hMR (d); A10 Zellen mit/ohne hGR-/ hMR-Überexpression

- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA durch NaCl nach 24- und 48 h Behandlung ohne hMR-Überexpression (Modulation  $\pm$  SEM;  $N \geq 3$ ; vs. Hydrokortison der jeweiligen Konzentration)
- NaCl-/ Mannit-abhängige Modulation der durch 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison induzierten GSA am endogenem GR durch MR-Inhibition (RU 28318 10  $\mu$ mol/l) mit hMR-Überexpression (Modulation  $\pm$  SEM;  $N \geq 3$ ; vs. Hydrokortison 1  $\mu$ mol/l + RU 38486 10  $\mu$ mol/l)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA durch NaCl/ Mannit mit hGR-Überexpression (Modulation  $\pm$  SEM;  $N \geq 3$ ; vs. Hydrokortison der jeweiligen Konzentration)
- Hydrokortison-induzierte GSA unter Modulation von NaCl/ Mannit mit hMR-Überexpression (Modulation  $\pm$  SEM;  $N \geq 3$ ; vs. Hydrokortison 1  $\mu$ mol/l)

Bei gleichzeitiger Aktivierung des hMR und des endogenen GR durch 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison fand sich ebenso kein modulierender NaCl-/ Manniteffekt (Abb. 22d). Diese Mischaktivität aus hMR und endogenem GR entsprach damit bezüglich der Aktivitätsmodulation durch NaCl/ Mannit den Einzelergebnissen der Rezeptoren aus den Inhibitorstudien. Daher ergaben sich in den A10 Zellen keine Hinweise für eine Interaktion zwischen endogenem GR

und hMR unter Stimulation mit 1  $\mu\text{mol/l}$  Hydrokortison und NaCl, wie sie sich in HEK-293 zeigten (Abb. 16). Einzig auf Ebene der Grundaktivität des endogenen GR fand sich eine Interaktion mit dem hMR. So nahm der hemmende Eigeneffekt des GR-Inhibitors RU 38486 durch die hMR-Überexpression ab (Daten nicht gezeigt). Der hMR führte also zu einer Absenkung der endogenen GR-Grundaktivität.

Aus denselben Gründen wie bei der Betrachtung des endogenen GR, konnte bei der Messung der hGR-Aktivität auf eine MR-Inhibition verzichtet werden. Ferner konnte davon ausgegangen werden, dass jede gemessene NaCl-Modulation durch den hGR verursacht wurde, da sich der endogene GR in seiner Aktivität durch NaCl nicht beeinflussen ließ. Unter den zwei getesteten Hydrokortisonkonzentrationen (100 nmol/l, 1  $\mu\text{mol/l}$ ) zeigte der hGR in den A10 Zellen (im Gegensatz zu den HEK-293) keine Aktivitätsmodulation durch NaCl oder Mannit (Abb. 22c).

Zusammenfassend konnte somit für endogenen GR und hGR in A10 Zellen kein modulierender Effekt auf die Rezeptoraktivität durch NaCl/ Mannit nachgewiesen werden. Ferner fanden sich keine Hinweise für eine NaCl-abhängige Interaktion zwischen endogenem GR und -MR sowie hMR. Einziger Hinweis auf eine MR-GR-Interaktion war die verminderte endogene GR-Grundaktivität durch eine zusätzliche hMR-Expression.

### 3.3 Interaktionen von Ouabain und MR/ GR

#### 3.3.1 Modulation der MR-Aktivität durch Ouabain $\pm$ NaCl in HEK-293 und A10 Zellen

##### *Ouabaineinfluss auf die GRE-Reporteraktivität*

Da in HEK-293 NaCl zu einer Steigerung der Aldosteron- und Hydrokortison-induzierten hMR-Affinität führte und bei Hypertonikern erhöhte NaCl-Konzentrationen und erhöhte Ouabainkonzentrationen nachgewiesen wurden [91, 113, 204], war es von Interesse wie es zu einer intrazellulären Akkumulation von  $\text{Na}^+$  kommen kann. Ouabain, als Inhibitor der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und möglicher Schlüsselspieler bei der Entwicklung einer Aldosteron-MR-induzierten Hypertonie, stellte dabei einen vielversprechenden Kandidaten dar.

Sowohl in HEK-293, als auch in A10 Zellen wurde der Einfluss unterschiedlicher Ouabainkonzentrationen auf die GRE-SEAP-Grundaktivität untersucht. Dies diente zum einen der Dosisfindung für die nachfolgenden Ouabainversuche und zum anderen dem Abgleich der eigenen Ergebnisse mit den in der Literatur angegebenen Ouabainaffinitäten der

unterschiedlichen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-Isoformen ATP1A1 und ATP1A2 (ATP1A3 werden in VSMC und HEK-293 nicht exprimiert [205, 206]).

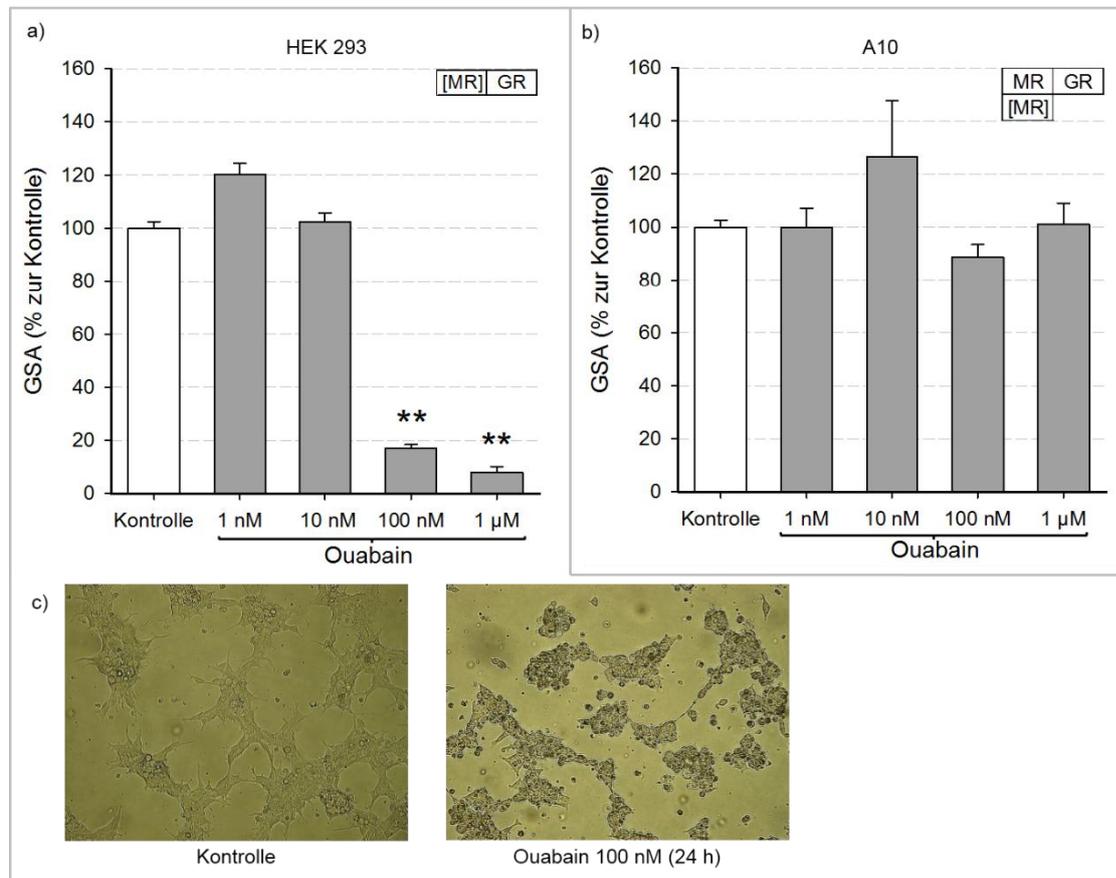


Abb. 23: Ouabaineinfluss auf die GRE-Reporteraktivität und das Zellaussehen in HEK-293 und A10 Zellen jeweils mit hMR-Überexpression

- Einfluss unterschiedlicher Quabainkonzentrationen auf die GSA in HEK-293 (MW ± SEM; N ≥ 3; \*\*p ≤ 0,01; vs. Kontrolle)
- Einfluss unterschiedlicher Quabainkonzentrationen auf die GSA in A10 Zellen (MW ± SEM; N ≥ 3; vs. Kontrolle)
- Mikroskopischer Effekt von 100 nmol/l Ouabain (24 h, rechts) auf HEK-293 im Vergleich zu nichtbehandelten Zellen (links) derselben Passage

In HEK-293 mit hMR-Überexpression hatten 1- und 10 nmol/l Ouabain keinen Eigeneffekt auf die GRE-SEAP-Grundaktivität. Ab einer Konzentration von 100 nmol/l Ouabain sank diese auf 20%-, im μmol/l Konzentrationsbereich auf Werte < 10% im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23a). Gleichzeitig kam es ab einer Ouabainkonzentration von 100 nmol/l zu einer Verminderung des Proteingehalts (Daten nicht gezeigt). Dies wurde als toxische Ouabainwirkung interpretiert, was sich mit den mikroskopisch nekrotischen Zellbefunden nach 100 nmol/l Ouabaininkubation nach 24 h deckte (Abb. 23c).

Im Gegensatz dazu, zeigte sich bei den A10 Zellen durch keine der getesteten Ouabain-

konzentrationen (1 - 1000 nmol/l) eine Beeinflussung der GRE-SEAP-Grundaktivität (Abb. 23 b) und des zellulären Proteingehalts (Daten nicht gezeigt).

#### *Ouabaineinfluss auf die Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierte hMR-Aktivierung*

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit Ouabain die Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierte hMR-Aktivität beeinflusst. Dazu wurden die Zellen unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen ausgesetzt und gleichzeitig gezielt der hMR durch Aldosteron bzw. Hydrokortison aktiviert.

Um den Ouabaineinfluss auf den hMR in HEK-293 festzustellen, wurde er mit 10 nmol/l Aldosteron und 10 nmol/l Hydrokortison stimuliert, da diese Ligandenkonzentrationen nur zu einer hMR und nicht zu einer gleichzeitigen Aktivierung des endogenen GR führten (Abb. 8a/b). Hierbei zeigte sich im Konzentrationsbereich bis 10 nmol/l Ouabain keine Modulation der Aldosteron- und Hydrokortison-induzierten hMR-Aktivität durch Ouabain (Abb. 24a). Erst bei Erreichen der toxischen Ouabainschwelle (100 nmol/l) zeigte sich eine positive Modulation der hMR-Aktivität (für Aldosteron und Hydrokortison). Diese Modulation war absolut gesehen allerdings vernachlässigbar klein und stellt sich hier nur aufgrund Berücksichtigung des massiv hemmenden Eigeneffekts dieser Ouabainkonzentration auf den GRE-Reporter dar (Abb. 23a).

Im Anschluss wurden mittels 1 µmol/l Hydrokortison hMR und endogenen GR gleichzeitig aktiviert (Abb. 24b). Das Summensignal zeigte dabei (wie für den alleinigen hMR) keine modulierende Ouabainwirkung. Für den endogenen GR kann man daher schlussfolgern, dass dessen Aktivität genauso wenig durch 10 nmol/l Ouabain beeinflusst wird wie die des hMR.

Da in den A10 Zellen der endogene MR nicht auf Aldosteron reagierte, wurde hier bereits zu Anfang der hMR überexprimiert. Die hMR-spezifische Stimulation erfolgte ausschließlich mit Aldosteron, da der endogene GR der A10 Zellen bereits auf 10 nmol/l Hydrokortison reagierte (Abb. 18c) und das alleinige hMR-Signal verfälschen würde. Im Konzentrationsbereich von 1 nmol/l - 1 µmol/l Ouabain fand sich für die Aldosteron-induzierte hMR-Aktivität keine Modulation durch Ouabain (Abb. 24c). Zur Beurteilung der Modulation der endogenen GR-Aktivität durch Ouabain wurde dasselbe Vorgehen wie in den HEK-293 gewählt. Mittels 10 nmol/l Hydrokortison wurden hMR und endogener GR der A10 Zellen aktiviert. Für 10 nmol/l Ouabain zeigte sich bei diesem Summensignal keine modulierende Wirkung (Abb. 24d), sodass von keiner Ouabainmodulation auf die endogene GR-Aktivität ausgegangen werden kann.

Zusammenfassend ließ sich also in keinem der beiden Zellsysteme, weder für den hMR

noch für den endogenen GR eine die Rezeptoraktivität modulierende Wirkung durch (patho-) physiologisch relevante Ouabainkonzentrationen nachweisen.

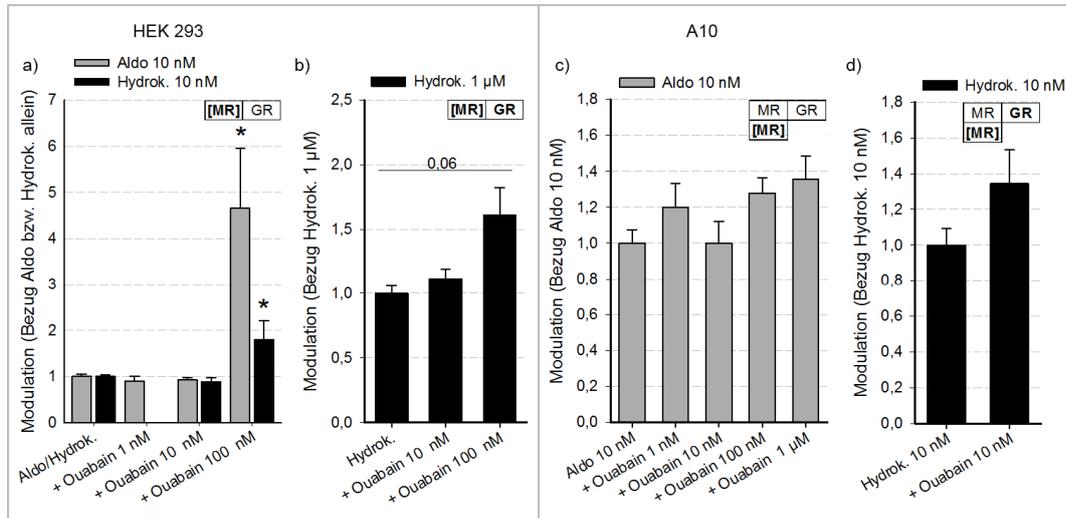


Abb. 24: Ouabaineinfluss auf die alleinige hMR-Aktivität und die gemeinsame Aktivität von hMR und endogenen GR in HEK-293 und A10 Zellen jeweils mit hMR-Überexpression

- Modulation der Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten hMR-Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen und unter Berücksichtigung des Ouabaineigeneffektes in HEK-293 (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; \*p  $\leq$  0,05; vs. Aldo 10 nmol/l bzw. Hydrokortison 10 nmol/l)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten GSA von hMR und endogenem GR in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen unter Berücksichtigung des Ouabaineigeneffektes in HEK-293 (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Hydrokortison 1  $\mu$ mol/l)
- Modulation der Aldosteron-induzierten hMR-Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen in A10 Zellen (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Aldo 10 nmol/l)
- Modulation der Hydrokortison-induzierten Summenaktivität von hMR und endogenem GR in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen in A10 Zellen (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Hydrokortison 10 nmol/l)

#### Gemeinsamer Einfluss von NaCl und Ouabain auf die Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierte hMR-Aktivität

Zuletzt wurde geprüft ob sich unter gleichzeitiger Exposition von 10 nmol/l Ouabain und NaCl eine Modulation der MR-/ GR-Aktivität zeigte.

HEK-293 wurden erneut mit 10 nmol/l Aldosteron oder 10 nmol/l Hydrokortison stimuliert um gezielt den hMR zu aktivieren. Die zusätzliche Behandlung mit NaCl zu 10 nmol/l Ouabain führte (wie Ouabain allein) zu keiner Modulation der Aldosteron- bzw. Hydrokortison-induzierten hMR-Aktivität (Abb. 25a). Der endogene GR der HEK-293 wurde in diesem Zusammenhang nicht getestet.

Auch in den A10 Zellen wurde der hMR mit 10 nmol/l Aldosteron aktiviert. Wurden zusätzlich

10 nmol/l Ouabain und NaCl 15 mmol/l appliziert, hatte dies keinen Einfluss auf die hMR-Aktivität (Abb. 25b). Da das Summsignal aus hMR und endogenem GR (durch Stimulation mit 10 nmol/l Hydrokortison) durch Ouabain und NaCl ebenfalls nicht veränderte wurde (Abb. 25c), ist auch ein modulierender Einfluss von Ouabain und NaCl auf den endogenen GR unwahrscheinlich.

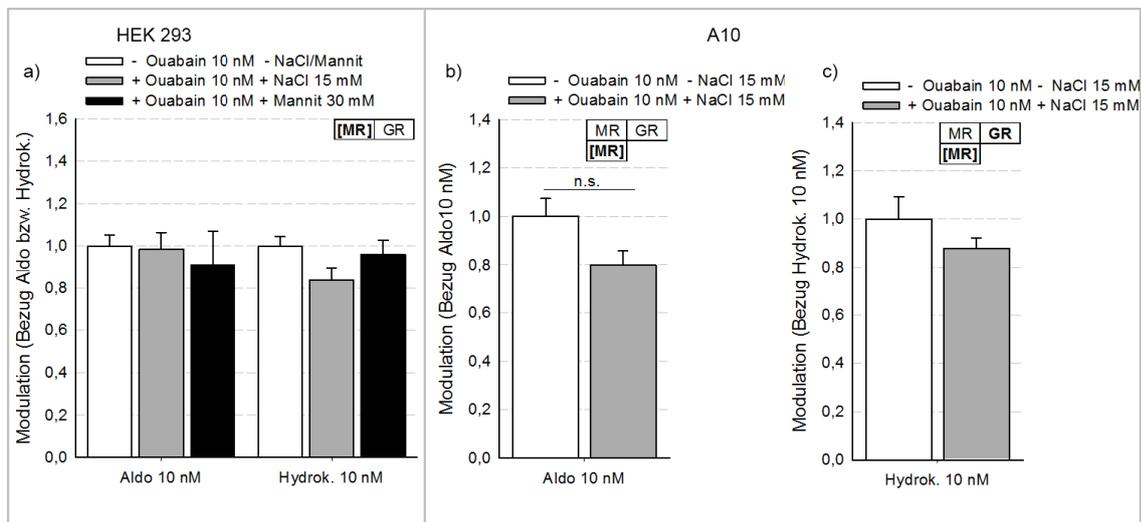


Abb. 25: Modulierende Effekte von NaCl und Ouabain auf die alleinige hMR-Aktivität und gemeinsame Aktivität von hMR und endogenem GR in HEK-293 und A10 Zellen mit transient transfizierten hMR

- Modulation der durch 10 nmol/l Aldosteron-/ Hydrokortison-induzierten hMR-Aktivität durch Kombination von 10 nmol/l Ouabain und NaCl 15 mmol/l in HEK-293 (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Aldo 10 nmol/l oder Hydrokortison 10 nmol/l)
- Modulation der durch 10 nmol/l Aldosteron induzierten hMR-Aktivität durch Ouabain 10 nmol/l und NaCl 15 mmol/l in A10 Zellen (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Aldo 10 nmol/l)
- Modulation der durch 10 nmol/l Hydrokortison induzierten GSA des hMR und endogenem GR durch die Ouabain 10 nmol/l und NaCl 15 mmol/l in A10 Zellen (Modulation  $\pm$  SEM; N  $\geq$  3; vs. Hydrokortison 10 nmol/l)

### 3.3.2 Ouabaineinfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase in HEK-293

Der zuvor in den HEK-293 gemessene stimulierende NaCl-Einfluss auf die hMR-Aktivität in den GRE-Reporter-Assays ließ sich unter Aldosteron, NaCl und Ouabain nicht reproduzieren. Daher wurde eine Ouabain-abhängige Hemmung der MR-induzierten Reporteraktivität vermutet. Für Ca<sup>2+</sup> konnte eine hemmende Wirkung der hMR-Aktivität nachgewiesen werden [15]. Eine Folge der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasen-Inhibition und konsekutiv erhöhter intrazellulärer Na<sup>+</sup>-Konzentrationen könnte der gesteigerte Na<sup>+</sup>-Export und Ca<sup>2+</sup>-Import durch den Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher sein. Zusätzlich konnte auch durch Beeinflussung der Signaltransduktionsdomäne der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch Ouabain eine Zunahme von Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen nachgewiesen werden [111]. Die so verursachten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-

Konzentrationssteigerungen, könnten hemmend auf die hMR-Aktivität wirken und somit den stimulierenden NaCl-Einfluss aufheben.

Um den Einfluss des Ouabains auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in HEK-293 zu sichern, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsmessungen, mithilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven FURA-2, unter Ouabaineinfluss durchgeführt. Dazu wurden aufsteigende Ouabainkonzentrationen (bis 1  $\mu\text{mol/l}$ ) eingesetzt. Da die Zellen nur während der Messung dem Ouabain exponiert wurden (max. 30 min), wurde nicht von einem vergleichbar starken toxischen Effekt des Ouabains ausgegangen wie er sich in den GRE-SEAP-Assays zeigte (hier 24 h Exposition).

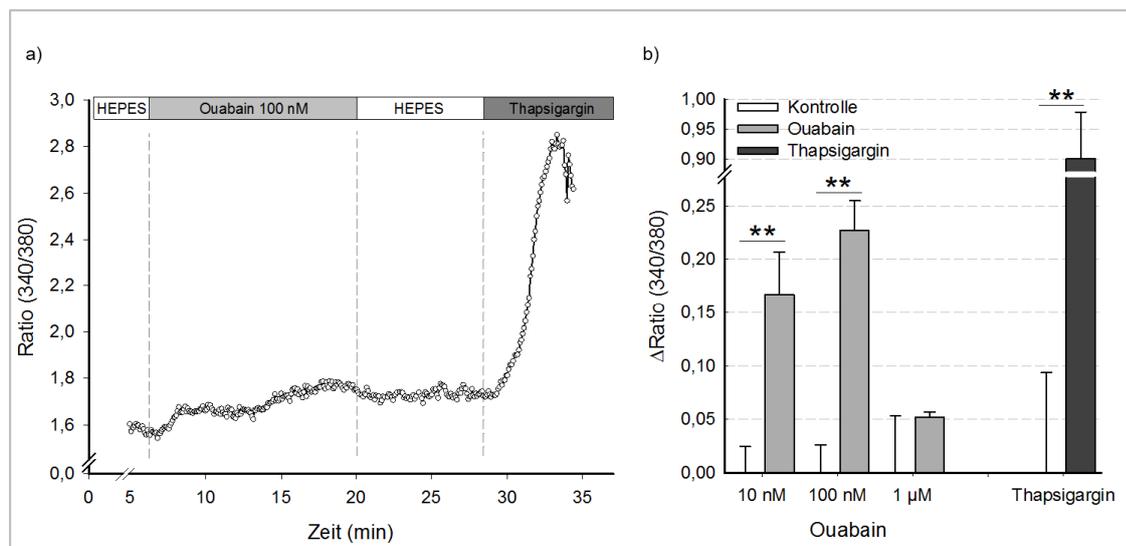


Abb. 26: Modulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen durch Ouabain in HEK-293

- Typische Reaktion einer Ouabain (100 nmol/l) u. Thapsigargin (100 nmol/l) sensiblen Zelle in der FURA-2-Messung
- Quantitativer Vergleich der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Veränderungen, hervorgerufen durch Ouabain und nachfolgendes Thapsigargin ( $\Delta\text{Ratio} \pm \text{SEM}$ ;  $N \geq 3$ ;  $**p \leq 0,01$ ; vs. Kontrolle)

Insgesamt reagierten circa 50% der Zellen auf Ouabain mit einem messbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg (Peak) und > 90% auf die Positivkontrolle Thapsigargin (Daten nicht gezeigt), exemplarisch dargestellt in Abb. 26a. Nach Subtraktion der gemittelten Ratios der Ruhebedingungen von der Peak Ratio, zeigte sich durch 10- und 100 nmol/l Ouabain eine signifikante Zunahme der  $\Delta\text{Ratios}$ , was einer Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration entspricht (Abb. 26b). Der unter 1  $\mu\text{mol/l}$  Ouabain gemessene Ratio-Anstieg, war bedeutend kleiner als unter den anderen getesteten Ouabainkonzentrationen, was durch eine toxische Wirkung dieser Ouabainkonzentration, trotz verkürzter Inkubationszeit, erklärt werden könnte. Thapsigargin induzierte in allen drei Ouabainkonzentrationsgruppen einen signifikanten  $\Delta\text{Ratio}$ - und damit  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg. Gemittelt entsprach dieser etwa dem vierfachen des maximalen Ouabain-induzierten  $\Delta\text{Ratio}$ -Anstiegs (Abb. 26b).

Zusammenfassend konnte ein Ouabain-bedingter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in HEK-293 nachgewiesen werden, welcher den NaCl-Einfluss auf die hMR-Aktivität hemmen könnte. Inwiefern die Konzentrationszunahme des  $\text{Ca}^{2+}$  durch eine Hemmung der ATP1A1-Aktivität oder durch eine Ouabain-induzierte und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase vermittelten Einfluss auf Signalkaskaden ausgelöst wurde, kann anhand dieser Experimente nicht geklärt werden.

### 3.3.3 Intrazelluläre $\text{Na}^+$ -Konzentrationsmodulation durch Ouabain in HEK-293

Zur Beantwortung zweier Fragestellungen wurden Messungen der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen in HEK-293 unter Ouabaineinfluss durchgeführt: Erstens, um zu klären ob ein intrazellulärer  $\text{Na}^+$ -Anstieg (verursacht durch Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase durch Ouabain) mit dem toxischen Ouabaineffekt, welcher in den GRE-SEAP-Assays beobachtet wurde, assoziiert ist. Zweitens ob sich der nachgewiesene Einfluss des Ouabains auf die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen über eine Inhibition der ATP1A1/2 erklären könnte. Nach Einstellung eines konstanten Ausgangsniveaus unter HEPES Puffer wurden die Zellen mit unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen (10-, 100-, 1000 nmol/l) und nachfolgend der Positivkontrolle inkubiert. Als Positivkontrolle wurde anfangs 100  $\mu\text{mol/l}$  Ouabain eingesetzt. Darauf reagierten nur 33% der untersuchten Zellen (19 von 58) und die gemessenen Ratioanstiege waren deutlich kleiner als erwartet (Abb. 27b). Aus diesem Grund wurde auf Nystatin als Positivkontrolle ausgewichen, worunter die Responderquote bei 100% lag (29 von 29). Da jede Zelle mikroskopisch auf ein vitales Aussehen überprüft wurde und sich in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen eine Responderquote von nahezu 100% auf die Positivkontrolle zeigte (Daten nicht gezeigt), wurde nicht zwangsläufig davon ausgegangen, dass Zellen die nicht auf 100  $\mu\text{mol/l}$  Ouabain reagierten avital waren. Reagierte daher eine Zelle auf 10, 100 oder 1000 nmol/l Ouabain, aber nicht auf die anschließende Positivkontrolle 100  $\mu\text{mol/l}$  Ouabain, wurde diese Zelle auch als Responder gewertet.

Über alle gemessenen Ouabainkonzentrationen hinweg fanden sich kleine Veränderungen der  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen (Abb. 27b), exemplarisch anhand einer Zelle in Abb. 27a dargestellt. Bei vergleichbar großem Einfluss der unterschiedlichen Ouabainkonzentrationen auf den  $\Delta\text{Ratio}$ -Anstieg, entstand die fehlende Signifikanz bei 100, 1000 nmol/l Ouabain wahrscheinlich nur aufgrund der geringeren Responderanzahl bei Ouabainkonzentrationen  $\geq 100$  nmol/l (Daten nicht gezeigt). Die Positivkontrolle Nystatin führte im Mittel zu einem 10 - 20 fach stärkeren  $\Delta\text{Ratio}$ -Anstieg als Ouabain (Abb. 27b). Es fand sich keine Abhängigkeit der Zeit bis zum Peak von der eingesetzten Ouabainkonzentration (Daten nicht gezeigt). Da die in den Reporter-Assays bestimmten toxischen Ouabainkonzentrationen ( $\geq 100$  nmol/l)

nicht zu einem höheren  $\Delta$ Ratio-Anstieg bzw. intrazellulärem  $\text{Na}^+$ -Anstieg führten als 10 nmol/l Ouabain, ist eine generalisierte ATP1A1-Inhibition nicht der Grund für die toxische Ouabainwirkung. Ferner fanden sich auch in diesen Experimenten Hinweise für die Toxizität hoher Ouabainkonzentrationen, da ebenfalls ab  $\geq 100$  nmol/l Ouabain die Responderraten abnahmen (Daten nicht gezeigt). Ein messbarer, geringer Einfluss pathophysiologisch relevanter Ouabainkonzentrationen (10 nmol/l) auf die  $\text{Na}^+$ -Homöostase konnte nachgewiesen werden. Somit wäre eine Beeinflussung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen durch Ouabain über die Modulation der  $\text{Na}^+$ -Konzentration möglich.

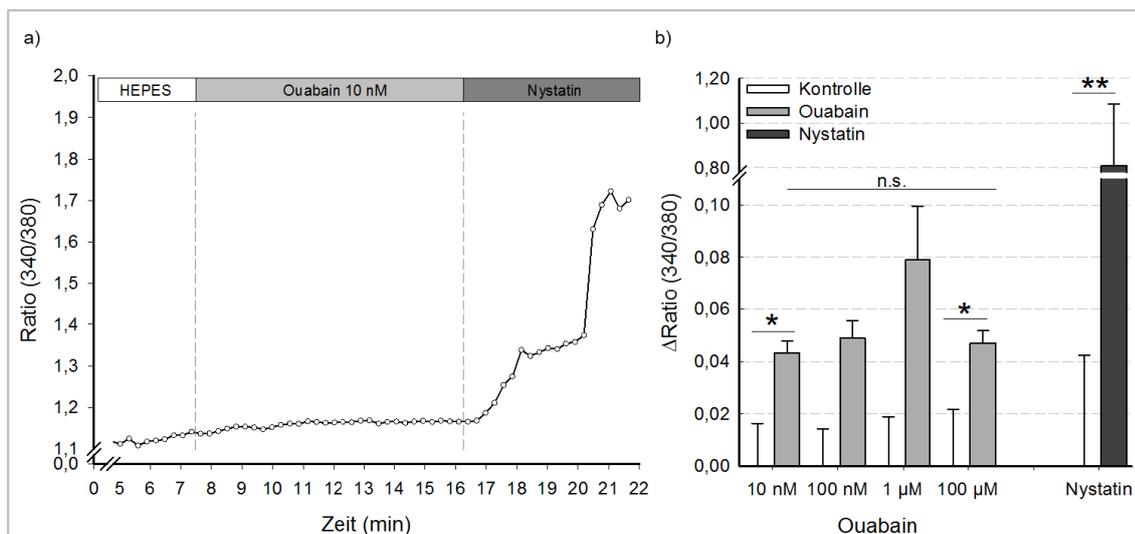


Abb. 27: Modulation der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration durch Ouabain in HEK-293

- Typische Reaktion einer Ouabain (10 nmol/l) und Nystatin (100  $\mu$ mol/l) sensiblen Zelle in der SBF1-Messung
- Quantitativer Vergleich der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Veränderungen hervorgerufen durch Ouabain und nachfolgendes Nystatin ( $\Delta$  Ratio  $\pm$  SEM;  $N \geq 3$ ; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; vs. Kontrolle)

## 4 Diskussion

Neben den physiologisch relevanten klassischen Wirkungen in polarisierten Epithelien (Volumen- und Blutdruckregulation) induziert der MR auch pathophysiologische epitheliale- und nicht epitheliale Wirkungen. Auf diesem Wege werden endotheliale Dysfunktion sowie renokardiovaskuläre Fibrose, auch unabhängig von einem erhöhten Blutdruck verursacht [3, 4, 160, 207-210]. Die klinische Bedeutung dieser pathologischen MR-Aktivität für kardiovaskuläre Erkrankungen, die häufigste Todesursache in den Industrienationen [1], wurde in zahlreichen klinischen Studien und tierexperimentelle Studien belegt [2-4, 149, 150]. Die Konsequenz war die Aufnahme von MR-Antagonisten in die Leitlinientherapie der Herzinsuffizienz (ab NYHA Stadium III) oder bei Zustand nach Myokardinfarkt mit klinischen Zeichen der Herzinsuffizienz. Der korrekten Regulation der MR-Aktivität und dem Wechsel von physiologischen- zu pathologischen MR Effekten kommt somit eine relevante Bedeutung zu.

Die Vielzahl der Wirkungen und Regulationen der Steroidrezeptoren lässt sich nicht mithilfe eines einfachen "An-Aus"-Mechanismus erklären, sondern erfordert eine genaue räumliche und zeitliche Interaktion einer Vielzahl von unterschiedlichen Modulatoren und Signalkaskaden [178]. Bezüglich der Regulierung der transkriptionellen MR-Aktivität stehen bisher wenige Erkenntnisse im Vergleich zu anderen Steroidrezeptoren zur Verfügung.

### 4.1 Modulation der MR-/ GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit

Von den wenigen genannten Faktoren von denen bekannt ist, dass sie die genomische MR-Aktivität modulieren, konzentriert sich diese Arbeit auf die Wirkung von erhöhten NaCl-Konzentrationen bzw. einer erhöhten extrazellulären Osmolalität. Da Kochsalz im Verdacht steht einen entscheidenden Beitrag zur pathologischen MR-Aktivität zu leisten [3, 4, 160, 207-210], bisher jedoch kein direkter Einfluss von NaCl auf die genomische MR-Aktivität gezeigt werden konnte, wurde in verschiedenen *in vitro* Modellen die MR-Rezeptoraktivität (und GR-Rezeptoraktivität zum Vergleich) hinsichtlich eines modulierenden NaCl-Effektes untersucht.

### 4.1.1 Mineralokortikoidrezeptor

#### *Pathophysiologische MR-Transaktivierungsaktivität durch Aldosteron*

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine geringe, osmolalitätsbedingte Modulation der genomischen MR-Aktivität nach 24 h Inkubationsdauer. Absolut war dieser Effekt sehr klein (induzierter  $v_{\max}$ -Anstieg von 4%) und ließ sich nur im Bereich pathophysiologischer (erhöhter) Aldosteronkonzentrationen (10 nmol/l) nachweisen. Damit lassen sich nicht die Studienergebnisse von RALES und EPHEsus erklären, die den Therapienutzen einer MR-Blockade in Abwesenheit von erhöhten Aldosteronkonzentrationen nachwiesen [3, 4]. Nach Verdopplung der Inkubationsdauer von NaCl oder Mannit, zeigte sich jedoch ein NaCl-spezifischer  $v_{\max}$  Anstieg am MR um 40%, ohne das ein relevanter Osmolalitätseffekt nachgewiesen werden konnte. Da es sich bei den durch die pathologische MR-Aktivität verursachten renokardiovaskulären Schäden um chronische Remodeling-Prozesse handelt, welche über Jahre entstehen, erscheint insbesondere dieser Zusammenhang von Inkubationsdauer und positiv modulierendem Einfluss des NaCl auf die Aldosteron-induzierte MR-Aktivität interessant, da somit auch bei geringeren, physiologischen Aldosteronkonzentrationen (<10 nmol/l) eine modulierende NaCl-Wirkung über einen größeren Untersuchungszeitraum denkbar erscheint.

#### *Pathophysiologische MR-Transaktivierungsaktivität durch Glukokortikoide*

Die Affinität der Glukokortikoide für den MR ist größer als die Affinität dieser für den GR [211]. Ferner bindet der MR Glukokortikoide mit derselben Affinität wie Aldosteron. Zusätzlich sind zirkulierende Glukokortikoidkonzentrationen 100 -1000 fach höher als die des Aldosterons [49, 185] und selbst in Geweben mit aktiver 11 $\beta$ -HSD II entspricht die verbliebene Kortisolkonzentration der zehnfachen Aldosteronkonzentration [194]. Funder *et al.* entwickelten daher die Hypothese, dass Glukokortikoide unter physiologischen Bedingungen mehr als 90% aller zellulären MR blockieren und in einem inaktiven Zustand halten [193-195] und sich in einem Milieu von Gewebeschädigung bzw. erhöhten ROS-Konzentrationen die antagonistische Wirkung physiologischer Glukokortikoidkonzentrationen am MR in eine agonistische umkehrt [45, 196, 197, 212]. Auch diese Theorie könnte die pathophysiologische MR-Aktivität in Abwesenheit von erhöhten Aldosteronkonzentrationen erklären. Verglichen mit kortikosteroidfreier Reperfusion zeigten Mihailidiou *et al.* in der Reperusionsphase von Rattenherzen nach myokardialer Ischämie eine gleichgroße Vergrößerung der „area at risk“ und der Apoptoserate bei zusätzlicher Aldosteron- oder Hydrokortisongabe (halbmaximaler Effekt für beide Kortikosteroide zwischen 1 und 10 nmol/l). Da Spironolacton diese Vergrößerung im Gegensatz zum GR-Antagonist RU 38486

hemmte, wurde von einem MR-vermittelten Effekt ausgegangen, welcher durch Aldosteron und Glukokortikoide induziert wurde [196, 212].

Auch mithilfe eines anderen Ansatzes ergaben sich Hinweise auf eine Glukokortikoid-induzierte pathophysiologische MR-Aktivierung. Wurde die 11 $\beta$ -HSD II in Ratten mittels Carbenoxolone gehemmt und somit die Kortisolinaktivierung blockiert, zeigten diese Tiere hinsichtlich arterieller Hypertonie, Herz- und Nierengewicht und Entzündungsmarkern keinen Unterschied zu solchen, welche mit dem Mineralokortikoid DOCA behandelt wurden [213]. Die Tatsache, dass zirkulierende Kortisolspiegel denen des Aldosterons als prognostischer Marker der Herzinsuffizienz leicht überlegen sind, stützt diese These [214].

Diesbezüglich konkordant sind die Daten aus dem heterologen Expressionssystem HEK-293, welche ebenfalls keine 11 $\beta$ -HSD II exprimieren [22]. Auch hier zeigte sich eine Aktivierung des MR durch Hydrokortison, wobei sich tendenziell die genomische, Hydrokortison-induzierte MR-Aktivität durch 48 h Inkubationsdauer mit NaCl steigern ließ. Somit könnte NaCl, wie auch bei der Aldosteron-induzierten MR-Transaktivierungsaktivität, den Wechsel von physiologischer zu pathologischer MR-Wirkung initiieren. Im Gegensatz zu den Aldosteronergebnissen lag die NaCl-Modulation der Hydrokortison-induzierten MR-Aktivität bereits im Bereich physiologischer Glukokortikoidkonzentrationen.

Auch die gewonnenen Ergebnisse aus der MR-GR-Interaktion geben Hinweise auf eine verstärkte MR-Aktivierung durch Glukokortikoide unter NaCl-Einfluss. Für die alleinige hMR-Transaktivierungsaktivität bei 1  $\mu$ mol/l Hydrokortison konnte eine stimulierende Modulation von NaCl nachgewiesen werden. Wurden hMR und endogener GR mittels derselben Hydrokortisonkonzentration gleichzeitig aktiviert, zeigte sich kein modulierender NaCl-Effekt (Abb. 16). Da die genomische Aktivität des endogenen GR nicht durch NaCl moduliert wurde, kann ein hemmender Effekt des NaCl auf die endogene GR-Aktivität nicht die Ursache des Verschwindens des NaCl-Effektes bei gleichzeitiger Aktivierung beider Rezeptoren sein. Denkbar wäre daher, das Hydrokortison unter NaCl-Einfluss verstärkt an den MR- zu Lasten des GR bindet, weshalb bei gleichzeitiger Aktivierung kein Unterschied am GRE-Reporter messbar ist. Alternativ könnte der fehlende modulierende NaCl-Effekt bei gleichzeitiger Aktivierung von GR und MR durch eine starke GRE-Aktivierung durch den GR bedingt sein, die den NaCl-Effekt in den Reporterassays maskiert. Bei Vorhandensein von MR-spezifischen HREs, wie zum Beispiel im EGFR [166], könnte jedoch eine positive NaCl-Modulation persistieren.

### *Mechanismus der NaCl-vermittelten Wirkung am MR*

Auch in der Gefäßwand konnten Hinweise für eine Aktivierung des MR durch Glukokortikoide nach Hemmung der 11 $\beta$ -HSD II nachgewiesen werden [213, 215]. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass durch Blockierung der 11 $\beta$ -HSD II und den konsekutiv verminderten Anfall von oxidiertem Nikotinamidadeninukleotidphosphat (NADPH ist Kosubstrat der 11 $\beta$ -HSD II) es auch immer zu einer Veränderung des zellulären Redoxzustandes kommt [45]. Daher kann anhand dieser Experimente nicht genau zwischen dem Einfluss der 11 $\beta$ -HSD II und des zellulären Redoxzustandes unterschieden werden [216]. Auch für die NaCl-vermittelte pathophysiologische MR-Aktivierung gibt es Hinweise für einen Redox-abhängigen Wirkmechanismus [141, 192]. So wurde in Geweben mit MR-induzierten Schäden, welche unter NaCl-Einfluss beobachtet wurden (und nicht unter NaCl-Restriktion), ein erhöhtes Aufkommen von ROS beobachtet [155, 191, 192, 217, 218]. NaCl nimmt dabei möglicherweise eine Initiationsfunktion ein, da es vaskulär eine Steigerung der ROS-Konzentration initiiert [46].

Passend dazu konnte ein Einfluss des Redoxstatus auf die MR-Aktivität gezeigt werden. L-Buthionin-S/R-Sulfoximin, ein Glutathion verbrauchendes Reagenz, steigert die MR-Aktivität [189] und nitrosaminer Stress, induziert durch Peroxinitrit, stimuliert ligandenunabhängig, spezifisch die MR-Transaktivierungsaktivität [187]. Im Gegensatz dazu senken NO-Donatoren die genomische MR- und GR-Aktivität [187].

Auch der MR selbst nimmt Einfluss auf den Redoxstatus. So konnte eine MR-abhängige Induktion der NADPH-Oxidase gezeigt werden, welche zu einer Steigerung der ROS-Konzentrationen führte [219-223]. Zusätzlich führte die Kombination aus Aldosteron und NaCl zu einer Aktivitätsreduktion der G6PD und 6PGD. Dadurch sinken die NADPH-Spiegel und konsekutiv die Glutathionregeneration, was letztlich die zelluläre, antioxidative Kapazität vermindert [161].

Zusammenfassend wird von einer Induktion pathophysiologischer MR-Effekte durch NaCl via Beeinflussung des Redoxzustandes ausgegangen. Nach Initiation der pathophysiologischen MR-Aktivität durch NaCl kann diese Wirkung wahrscheinlich aufgrund des positiven Feedbacks des MR auf den Redoxstatus ohne weitere schädliche Einflüsse (z.B. erhöhte Aldosteron-/ Kortisolkonzentrationen) aufrechterhalten werden (circulus vitiosus) [46, 197].

### *Ausblick*

Trotz der vielversprechenden Theorien zur MR-Aktivierung abseits dessen physiologischer Funktion, gibt es noch offene Fragen und zu klärende Widersprüche. Weiterhin unklar bleibt, welcher Ligand (Aldosteron oder Kortisol) die tragende Rolle bei der pathophysiologischen

MR-Aktivierung trägt. Da MR-Effekte zell- bzw. gewebespezifisch sind [163] und diese Arbeit eine NaCl-abhängige Zunahme der MR-Transaktivierungsaktivität sowohl unter Aldosteron als auch unter Hydrokortison zeigte, liegt die Antwort eventuell in der Unterscheidung zwischen verschiedenen Geweben. Klassische, epitheliale Aldosteron Zielgewebe exprimieren 11 $\beta$ -HSD II in relevanten Mengen [46], sodass hier dem Effekt der gesteigerten Aldosteron-MR-Aktivität durch NaCl möglicherweise mehr Einfluss beigemessen werden kann als dem vergleichbaren Effekt des Hydrokortisons. Andererseits könnte der Glukokortikoid- über den Aldosteronbeitrag in nicht klassischen, nicht epithelialen Aldosteron Zielgeweben dominieren, da diese über keine bzw. eine deutlich geringere 11 $\beta$ -HSD II Expression verfügen [224-228]. Gegen einen relevanten Glukokortikoidbeitrag am MR spricht wiederum, dass durch Hemmung der Aldosteronsynthese renale und vor allem kardiale Schäden (typisches nicht klassisches Aldosteron Zielgewebe) in vergleichbarem Ausmaß gehemmt wurden, wie unter MR-Blockade [43].

Eine weitere spannende Frage ist der Beitrag der nichtgenotropen Aldosteron-MR-Wirkungen an den verursachten NaCl-abhängigen Endorganschäden. Von erheblicher pathophysiologischer Bedeutung scheint auch die nichtgenomische, MR-unabhängige Aldosteronwirkung, was sich anhand zahlreicher Reviews zu diesem Thema erkennen lässt [68, 71, 74]. Auch die Tatsache, dass sowohl Spironolacton als auch Eplerenon partiell die nichtgenomische, MR-unabhängige Aldosteronwirkung über GPR30 blockieren [67, 182], stützt die These eines relevanten Beitrags. Denn somit wäre denkbar, dass der therapeutische Nutzen dieser Inhibitoren nicht allein auf Grundlage der Inhibition genomischer MR Wirkungen beruht. Dies würde auch erklären, warum einige tierexperimentelle Studien ein Spironolacton-Effekt zeigten, obwohl die verwendete Dosis deutlich unter der für die MR-Blockierung notwendigen lag [229].

#### 4.1.2 Glukokortikoidrezeptor

*Unterschiede in der Hydrokortison-induzierten GR-Aktivität zwischen dem endogenem GR und der hGR-Überexpression*

Eine mögliche Erklärung für die höhere Reporteraktivität bei zusätzlicher hGR-Überexpression und  $\mu$ molaren Hydrokortisonkonzentrationen (Abb. 8b) ist die Rezeptorüberexpression. Im  $\mu$ mol/l Konzentrationsbereich liegt ein Ligandenüberschuss vor und die Rezeptoranzahl ist das limitierende Element, sodass die größere Rezeptoranzahl unter hGR-Überexpression zu einer höheren GSA führt. Jedoch lässt sich damit nicht die Rechtsverschiebung der EC<sub>50</sub> durch die hGR-Überexpression erklären. Allerdings zeigten

Yudt *et al.*, dass von der GR $\alpha$ -Form, welche maßgeblich für die Liganden-abhängige GR-Transaktivierungsaktivität verantwortlich ist, zwei Formen (GR $\alpha$ -A und GR $\alpha$ -B) koexprimiert werden und sich diese in ihrer Transaktivierungsaktivität unterscheiden [29]. Die kürzere GR $\alpha$ -B-Variante ist dabei die aktivere und beide Formen werden von den HEK-293 koexprimiert [29]. Denkbar ist, dass durch hGR-Überexpression das Verhältnis beider Formen in Richtung inaktivere GR $\alpha$ -A verschoben wird. Dies könnte die beobachtete Rechtsverschiebung der EC<sub>50</sub> erklären. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre eine Veränderung des Verhältnisses von Transaktivierung stimulierender GR $\alpha$ - und Transaktivierung hemmender GR $\beta$ -Isoform durch die hGR-Überexpression.

#### *Modulation der GR-Aktivität durch NaCl/ Mannit*

Für den hGR konnte eine osmolalitätsabhängige Modulation der Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden, welche sehr gut mit der Funktion der Regulierung des Zellvolumens des GR (u.a. durch Aktivitätsmodulation des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers [230]) vereinbar ist.

Eine NaCl-spezifische Steigerung der GR-Transaktivierungsaktivität hingegen stellt eine neue, bisher unbekannte Modulation des GR dar. Aufgrund antiinflammatorischer Effekte die über den GR vermittelt werden [198], wäre eine gesteigerte GR-Aktivität in einem Milieu mit gleichzeitig auftretender pathophysiologischer MR-Aktivität ein potenzieller Schutzmechanismus. Sofern dieser Mechanismus existiert, wäre er in HEK-293 nicht vom Vorhandensein des MR abhängig, da diese Zellen eine NaCl-medierte Steigerung der Hydrokortison-induzierten GR-Aktivität auch in Abwesenheit des MR zeigten.

Gegen diesen Schutzmechanismus sprechen Ergebnisse von Rickard *et al.* Diese zeigen in uninephrektomierten Ratten, welche mit DOCA behandelt wurden, dass Eplerenon die kardiale Hypertrophie und Fibrose sowie die vaskuläre Entzündung mildert, wohingegen sich unter GR-Blockade mit RU 38486 unveränderte kardiale Schäden feststellen ließen [197]. Somit ließ sich unter diesen Bedingungen keine protektive (antiinflammatorische) GR-Wirkung in Anwesenheit einer pathophysiologischen MR-Aktivität nachweisen.

Da gezeigt werden konnte, dass in einem pathologisch veränderten Milieu die Expression der Transaktivierung hemmenden GR $\beta$  Isoform zunimmt, könnte unter dem Aspekt einer chronischen Gewebsschädigung die Veränderung des GR $\alpha$ /GR $\beta$ -Verhältnisses langfristig die u.a. antiinflammatorische Wirkung der GR $\alpha$ -Isoform hemmen [33, 231] und so den scheinbaren Widerspruch um die antiinflammatorische GR-Funktion lösen.

Kürzlich gelang es, eine GR Beteiligung bei der Salz-sensitiven Hypertonie nachzuweisen [232]. So führt eine GR-Aktivierung im distalen Nephron zu einer Herabregulation der *WNK lysine deficient protein kinase 4* (WNK4) [232]. Die Folge ist eine gesteigerte Aktivität des

Na<sup>+</sup>-Cl-Kotransporters und des ENaC, was über eine gesteigerte Na<sup>+</sup>-Reabsorption zu einem gesteigertem Blutdruck führte [233, 234]. Dieser GR-Beitrag zur Salz-sensitiven Hypertonie ist eventuell der Grund, warum Trilostan, ein Syntheseinhibitor für Aldosteron und Kortikosteron, den erhöhten Blutdruck effektiver senkt als ein Aldosteron-Synthese-Inhibitor allein [126].

Die hier nachgewiesene positive Modulation der GR-Aktivität durch NaCl lässt in diesem Zusammenhang ein positives Feedback vermuten, da die gesteigerte Na<sup>+</sup>-Reabsorption über eine gesteigerte GR-Aktivität wiederum zu einer Steigerung der Na<sup>+</sup>-Reabsorption führt. Nach Überschreitung eines kritischen Grenzwertes wären keine weiteren pathologischen Einflüsse erforderlich, da sich der Kreislauf von selbst aufrechterhält.

### 4.1.3 Ergebnisbewertung des A10 Zellsystem

Die A10 Zellen entstammen der thorakalen Aorta embryonaler Ratten und sind ein häufig genutztes Modellsystem zur Untersuchung von VSMC. Humane VSMC exprimieren die 11 $\beta$ -HSD Typ I und II [167, 235, 236], wobei Typ I inaktives Kortison zu Kortisol aktiviert und Typ II die Rückreaktion katalysiert [237]. Auch die A10 Zellen exprimieren diese beiden Enzyme [238]. Ferner konnte in humanen VSMC und in A10 Zellen als Reaktion auf proinflammatorische Reize (Kombination aus Interleukin 1 $\beta$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) eine Stimulation der mRNA-Expression der 11 $\beta$ -HSD-I- bzw. eine gehemmte mRNA-Expression der 11 $\beta$ -HSD II beobachtet werden [235, 238]. Bezüglich der Theorie der pathologischen MR-Aktivierung durch Glukokortikoide, war dies eine interessante Ausgangssituation und da die MR-mRNA in diesen Zellen bereits nachgewiesen wurde [238], erschienen dieses Modellsystem als ein geeignetes differenziertes Zellmodell zur Verifizierung der Ergebnisse aus den HEK-293.

Umso überraschender war die Tatsache, dass der endogene MR dieser Zellen keine Reaktion auf die endogenen Liganden Aldosteron und Hydrokortison zeigte und sich somit als funktionell nicht aktiv darstellte.

Im Gegensatz dazu wurde für den endogenen GR (Ratte) der A10 Zellen eine höhere Ligandenaffinität als beim humanen GR (hGR) festgestellt. Der Umstand, dass in Ratten im Gegensatz zum Menschen Kortikosteron und nicht Kortisol das dominierende Glukokortikoid ist, erklärt eventuell den Mangel an Bindungsstudien für Kortisol zum GR der Ratte (rGR) bzw. den Mangel an hGR-Affinitätsstudien zu Kortikosteron. Dies erschwert die direkte Einordnung der ermittelten Ergebnisse, welche ausschließlich mit Kortisol erzielt wurden. Ein Vergleich des hGR und dem rGR hinsichtlich Kortisol wurde nur von Yu *et al.* durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass sich hGR und rGR in neuronalem Gewebe, hinsichtlich

ihrer Dexamethason-, Betamethason-, Kortisol- und Kortikosteron-Affinität nicht unterscheiden [239]. Somit müssen auch die Ergebnisse für den rGR kritisch betrachtet werden.

Es stellt sich ferner die Frage, inwieweit die A10 Zellen in diesen Punkten entdifferenziert sind bzw. in wie weit sie wirklich einen VSMC-Charakter aufweisen. Für den VSMC Charakter der A10 Zellen spricht neben den bereits erwähnten Punkten die Tatsache, dass die Zellen  $\alpha$ -Actin, SM22- $\alpha$ , Calponin und Vimentin exprimieren [240]. Auf der anderen Seite exprimieren sie nicht die schwere Kette des Myosins der VSMC, *Platelet-derived growth factor- $\beta$*  Rezeptoren und Desmin, und können daher nicht als differenzierte, adulte VSMC charakterisiert werden [240]. Zusammen mit ihrem epitheloiden Aussehen, welches sich vaskulär vor allem nach Intimaverletzungen beobachten lässt (in unverletzten Gefäßen dominieren spindelförmige VSMC [241]), entspricht dieses Zellmodell am ehesten neointimalen Zellen [240].

Hinsichtlich des transient transfizierten hMR und hGR fanden sich deutliche Unterschiede zwischen HEK-293 und A10 Zellen. So konnte unter keiner der getesteten Bedingung der stimulierende Einfluss von NaCl oder von Mannit aus den HEK-293 verifiziert werden. Einzig das Verschwinden der negativen NaCl-Modulation nach 24 h Behandlung am hMR bei Verlängerung der NaCl-Inkubationsdauer auf 48 h deutet auf einen zeitabhängigen positiv stimulierenden NaCl-Einfluss am hMR in den A10 Zellen hin, wie er in den HEK-293 nachgewiesen werden konnte.

Da die Ergebnisse der endogenen Rezeptoren und die der transient transfizierten humanen Steroidrezeptoren (hMR und hGR) in den A10 Zellen unterschiedliche NaCl-Modulationen als in den HEK-293 zeigten sind Spezieseffekte möglich und die Bewertung ist schwierig. Daher sollten die Kernaussagen aus diesen beiden Zellmodellen in weiteren Experimenten mit einer Primärkultur analysiert werden.

## 4.2 Interaktionen von Ouabain und MR/ GR

Das kardiotope Steroid Ouabain hat, genau wie Aldosteron, eine regulierende Funktion auf den Langzeit-Blutdruck [90, 91], wobei sowohl NaCl, als auch das RAS in dessen Regelkreise mit einbezogen sind [88, 89]. Aufgrund der Einzelfunktionen beider Hormone, wie auch aufgrund ihrer funktionellen Verbindung ist es nicht überraschend, dass Ouabain, Aldosteron und Ang II die Schlüsselrolle in der NaCl-Homöostase und Blutdruckregulation zugeschrieben wird [89].

Für Aldosteron und Ouabain wurden zentrale und peripher wirksame Mechanismen

beschrieben, über die beide Hormone einen Beitrag zur Entstehung der arteriellen Hypertonie leisten. Völlig unklar ist jedoch, inwiefern Ouabain durch Inhibition  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase oder Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden die genomische MR-Aktivität beeinflusst und inwiefern NaCl eine modulierende Funktion hierbei zukommt.

#### *Ouabain Toxizität*

HEK-293 und A10 Zellen unterschieden sich deutlich in ihrer Reaktion auf unterschiedliche Ouabainkonzentrationen. Während 100 nmol Ouabain in HEK-293 zur Nekrose führten, zeigten Ouabainkonzentrationen bis zu 1  $\mu\text{mol/l}$  in A10 Zellen keine toxische Wirkung. Diese Unterschiede zwischen den Zelllinien lassen sich mit den in der Literatur verfügbaren Ouabainaffinitäten für die ATP1A1 in Einklang zu bringen. Da die humane ATP1A1 eine deutliche höhere Affinität für Ouabain besitzt als die ATP1A1 der Ratte ( $\text{EC}_{50}$  10-20 nmol/l vs.  $\text{EC}_{50} \sim 5 \mu\text{mol/l}$ ) [93, 242, 243], wird die humane ATP1A1 bereits durch geringere Ouabainkonzentrationen gehemmt. Da diese ATPase Isoform circa 80% aller zellulären  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen ausmacht [95, 96, 206], hat sie einen maßgeblichen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Gradienten und damit auf die Zellhomöostase. Die Ergebnisse aus den HEK-293 mit Ouabainkonzentrationen  $\geq 100$  nmol/l spiegeln diesen Einfluss wieder (durch Hemmung der ATP1A1 induzierter Abfall der GSA und des zellulären Proteins), wohingegen die geringere Affinität der ATP1A1 der A10 Zellen der Ratte eine Hemmung dieses Proteins verhindert und es folglich zu keiner Veränderung der GSA und des zellulären Proteingehalts kommt. Die Grenze der toxischen Ouabainwirkung (100 nmol/l) in HEK-293 wurde auch in Primärkulturen von humanen VSMC nachgewiesen, wohingegen sich in primär kultivierten VSMC von Nagern keine toxische Wirkung nachweisen ließ [101].

#### *Potenzielle Mechanismen der Beeinflussung der genomischen MR-Aktivität durch Ouabain*

Unter Verwendung eines GRE-Reporters ließ sich weder in HEK-293 noch in A10 Zellen ein modulierender Einfluss physiologisch relevanter Ouabainkonzentrationen auf die MR- und GR-Transaktivierungsaktivität nachweisen. Daran änderte auch die zusätzliche Anwesenheit von NaCl nichts. Unter Berücksichtigung der Vorergebnisse der HEK-293 verschwand jedoch Ouabain-abhängig der stimulierende NaCl-Einfluss auf die MR-Aktivität, sodass sich hier ein hemmender Ouabaineinfluss vermuten lässt. Da für Ouabain ein Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation [109, 111] und für den MR eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Hemmung der MR-Transaktivierungsaktivität beschrieben wurde [15] lag die Vermutung nahe, dass  $\text{Ca}^{2+}$  für diese Hemmung verantwortlich sein könnte. Dieser Verdacht wurde erhärtet, da es gelang eine Ouabain-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Steigerung in den HEK-293 nachzuweisen. Physiologische Relevanz hätte dieser Mechanismus für die Ouabain-abhängige Hemmung der

blutdrucksteigernden Wirkung einer hohen NaCl-Zufuhr [90, 91]. Die Ouabain-abhängige Steigerung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration würde in den Endothelien der Sammelrohre über eine Hemmung der MR-Aktivität zu einer verminderten NaCl-Reabsorption führen und somit die Aldosteron-MR-abhängige Blutdrucksteigerung reduzieren. Interessant ist dabei, dass sich dieser hemmende Ouabaineffekt nur unter gleichzeitiger Gabe von Aldosteron, Ouabain und NaCl und nicht durch Ouabain allein oder die Kombination von Aldosteron und Ouabain abbilden ließ.

Eine weitere mögliche Interaktionsebene beider Hormone sind die intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen. Hier konnten geringfügige  $\text{Na}^+$ -Konzentrationssteigerungen durch pathophysiologisch relevante Ouabainkonzentrationen in HEK-293 nachgewiesen werden. Allerdings nahmen diese bei Steigerung der Ouabainkonzentration bis in den hohen  $\mu\text{mol/l}$  Bereich nicht zu, obwohl bei diesen Konzentrationen mit einer sicheren Hemmung der humanen ATP1A1 zu rechnen ist ( $\text{EC}_{50}$  von 10 - 20  $\text{nmol/l}$  [93, 242, 243]) und konsekutiv eine deutliche  $\Delta\text{Ratio}$  Zunahme erwartet gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer  $\Delta\text{Ratio}$ -Zunahme bei Steigerung der Ouabainkonzentration trotz ähnlicher Ouabainaffinitäten der ATP1A1 und ATP1A2 [98, 243-245], könnte die präferentielle ATP1A2 Inhibition durch Ouabain sein. Da gezeigt werden konnte, dass es durch 5  $\text{mmol/l}$  Kalium zu einem 3-4 fach stärkeren Anstieg der  $K_d$  der ATP1A1 als der ATP1A2 führen [98], ist unter diesen Bedingungen die Ouabainaffinität der ATP1A2 höher als die der ATP1A1. Da der verwendete HEPES Puffer ebenfalls 5,4  $\text{mmol/l}$  Kalium enthielt, könnte dies die erwartete  $\Delta\text{Ratio}$ -Zunahme bei Steigerung der Ouabainkonzentration deutlich senken. Da die ATP1A2 nur 20 % aller zellulären  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen ausmacht [95, 96, 206] und selbst ein kompletter ATP1A2 knockout (wäre mit einer kompletten Hemmung aller ATP1A2 durch Ouabain gleichzusetzen) nur zu einem intrazellulären  $\text{Na}^{2+}$ -Anstieg um 1 - 2  $\text{mmol/l}$  führen würde [95], lassen sich die erhaltenen Ergebnisse für 10  $\text{nmol/l}$  Ouabain sehr gut mit einer Inhibition der ATP1A2 erklären. Bei solch geringen Veränderungen der  $\text{Na}^+$ -Konzentration sind deutlich größere  $\Delta\text{Ratios}$  nicht zu erwarten, da die theoretisch messbaren, von der  $\text{Na}^+$ -Bindung-abhängigen Veränderungen der Ratio für SBFI im Vergleich mit anderen Indikatoren relativ klein sind (sie betragen selten mehr als 10-20 %) und daher das Signal-Rausch-Verhältnis nicht optimal ist. So verursacht ein intrazellulärer  $\text{Na}^+$ -Anstieg um 5,5  $\text{mmol/l}$  im Mittel nur einen  $\Delta\text{Ratio}$  um 10 % [246].

Da jedoch auch kleinste Änderungen der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration einen wesentlichen Einfluss auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (und damit auf die intrazelluläre Signalgebung und die Kontraktilität) über den NCX und den intrazellulären pH über den NHE haben, kann die biologische Relevanz dieser geringen  $\text{Na}^+$ -Anhebung durch Ouabain enorm sein.

Aufgrund der wahrscheinlich höheren Ouabainaffinität der ATP1A2 im physiologischen Kontext und der Tatsache, dass in humanen VSMC nur die humane ATP1A2 (und nicht die ATP1A1) in engem räumlichen Zusammenhang mit sarkoplasmatischem Retikulum, NCX1 und ROC steht [101], wird ihr beim Menschen eine ähnlich zentrale Rolle in der Pathogenese der Hypertonie zugeschrieben wie der ATP1A2 der Nager [243].

#### *Ausblick*

Neben den beschriebenen Interaktionsmöglichkeiten ist eine Ouabain-abhängige Beeinflussung der genomischen MR-Aktivität auf Ebene des zellulären Redoxzustandes denkbar, da Ouabain durch Einfluss auf die Signal-Transduktions-Domäne der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase zu einer vermehrten ROS-Bildung beitragen kann [109, 111] und andererseits die MR-Aktivität durch den Redoxzustand beeinflusst wird [187, 189].

Bezüglich der Ouabain-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationssteigerungen kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht vorhergesagt werden, ob dieser Anstieg allein durch Hemmung der Ionenaustauscheraktivität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase induziert wurde und/ oder über deren Signal-Transduktions-Domäne. Hier sind weitere Untersuchungen im einstelligen nano- und subnanomolaren Ouabainkonzentrationsbereich notwendig, für welche keine hemmende Wirkung auf die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase anzunehmen ist.

Ebenso spannend sind die bereits in der Einleitung beschriebenen Veränderungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch funktionelles Remodeling. So zeigte sich in frisch isolierten VSMC von Ratten mit Ouabain-induzierter Hypertonie eine gesteigerte Expression von NCX1 und TRPC6 [108, 148] und in humanen VSMC nach 72 h Exposition mit 10 nmol/l Ouabain eine ebenso verstärkte Expression des NCX1 und der sarkoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-ATPase, was letztlich zu einer verstärkten ATP-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum führte [101, 161]. Bei Betrachtung eines größeren Zeitfensters, lassen sich somit weitere Ouabain-induzierte Veränderungen feststellen, welche ebenso einen Beitrag zur Entwicklung der arteriellen Hypertonie leisten könnten.

## 5 Zusammenfassung

Der MR ist ein Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor [5, 247, 248] und gehört zur Familie der Steroidrezeptoren. Zusammen mit dem endogenen Liganden Aldosteron ist der MR für die Langzeitblutdruckregulation verantwortlich.

Durch eine NaCl-reiche Ernährung kommt es MR-abhängig, wahrscheinlich durch eine Steigerung der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration, zur Stimulation des Sympathikotonus und des peripheren Gefäßwiderstandes was zur Entwicklung einer Hypertonie führt. Diese stellt einen wichtigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Zusätzlich zeigte sich in klinischen Studien, dass MR-abhängig renokardiovaskuläre Schäden unabhängig von einem erhöhten Blutdruck auftreten können. Hier steht NaCl im Verdacht als Auslöser und molekularer Schalter zwischen physiologischer und proinflammatorischer bzw. profibrotischer MR-Aktivität zu fungieren.

Da eine NaCl-reiche Ernährung zu einer nachweisbaren Steigerung der Plasma Na<sup>+</sup>-Spiegel führt und keine Erkenntnisse über einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhten extrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentrationen und der MR-Aktivität vorliegen, wurde dies initial in einem gut kontrollier- und reproduzierbaren heterologen Expressionssystem (HEK-293) getestet. Da nicht bekannt ist, ob die pathologische MR-Wirkung durch eine Mineralo- oder Glukokortikoid-induzierte MR-Aktivierung erfolgt, wurde die MR-Aktivität unter Aldosteron und Hydrokortison untersucht. Als Vergleichsrezeptor diente der GR.

1. Für pathophysiologisch relevante Aldosteronkonzentrationen konnte durch NaCl eine Zunahme der genomischen MR-Aktivität nachgewiesen werden. Dieser Effekt ließ sich erst nach 48- und nicht bereits nach 24 h Inkubationsdauer nachweisen. Somit ist eine stimulierende Wirkung bei physiologischen Aldosteronspiegeln (in den klinischen Studien waren die Aldosteronkonzentrationen nicht erhöht) in einem längeren Untersuchungszeitraum denkbar. Die NaCl-induzierte Steigerung der genomischen MR-Aktivität ist daher eine mögliche Ursache der pathologischen MR-Wirkung.

2. Des Weiteren wurde getestet, ob sich die beschriebenen Effekte durch Steigerungen der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration durch Ouabain (ein kardiotoxisches Steroid, welches die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase hemmt) reproduzieren lassen. Trotz einer nachweisbaren Steigerung der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration durch Ouabain, ließ sich kein Effekt auf die genomische MR-Aktivität nachweisen. Möglicherweise aufgrund der gleichzeitigen Stimulation der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Ouabain, für welche eine hemmende Wirkung auf die MR-Aktivität beschrieben ist.

3. Die genomische GR-Aktivität wurde unter physiologisch relevanten Hydrokortisonkonzentrationen sowohl durch NaCl als auch durch eine höhere Osmolalität gesteigert. Dabei lässt sich der Einfluss der Osmolalität sehr gut mit der Rolle des GR bei der Zellvolumenregulation vereinen. Die darüber hinaus festgestellte, osmolalitätsunabhängige Affinitätssteigerung des GR durch NaCl könnte den kürzlich entdeckten Beitrag des GR in der NaCl-abhängigen Hypertonie initiieren. NaCl hätte dementsprechend auch für den GR eine Initiationsfunktion für pathophysiologische Rezeptorwirkungen.

4. In einem zweiten Schritt erfolgte die Verifizierung der Ergebnisse in einem differenzierten Zellsystem mit vaskulärem Charakter aus der Ratte, den A10 Zellen. Überraschender Weise führte die Stimulation des endogen exprimierten MR der A10 Zellen mit Aldosteron oder Hydrokortison zu keiner signifikanten Rezeptoraktivität am Reporter, sodass von einem nicht funktionalen endogenen MR auszugehen ist. Erst durch Überexpression des hMR konnte eine genomische Rezeptoraktivität nachgewiesen werden, wobei sich keine direkte stimulierende NaCl-Wirkung (wie in den HEK-293) nachweisen ließ.

5. Der endogene GR der A10 Zellen zeigte eine höhere Affinität für Hydrokortison als der endogene GR der HEK-293, was sich mit der verfügbaren Literatur nicht in Einklang bringen lässt. Eine NaCl- oder osmolalitätsabhängige Modulation der genomischen GR-Aktivität ließ sich weder für den endogenen GR noch den hGR nachweisen.

**Fazit:** Am hMR konnte nach 24 h Inkubationsdauer eine Osmolalitäts-abhängige Stimulation der Transkriptionsaktivität unter Aldosteron und Hydrokortison nachgewiesen werden. Nach 48 h Inkubation ließ sich ein Osmolalitäts-unabhängiger, stimulierender NaCl-Effekt auf die hMR-Rezeptoraktivität unter Aldosteron, sowie tendenziell auch unter Hydrokortison, nachweisen. Pathophysiologisch relevante Ouabainkonzentrationen führten trotz eines nachweisbaren, stimulierenden Effekts auf die intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration nicht zu einer gesteigerten hMR-Rezeptoraktivität. Die hGR-Transaktivierungsaktivität ließ sich sowohl Osmolalitäts-abhängig, als auch -unabhängig durch NaCl nach 24 stündiger Inkubation steigern. Da sich die Ergebnisse nicht in einem zweiten Zellmodell (A10 Zellen) reproduzieren ließen und Spezieseffekte nicht ausgeschlossen werden können, sollten die Bedingungen in denen sich Veränderungen in den HEK-293 zeigten in einem differenzierten, humanen Zellmodell (z.B. in humanen aortalen VSMC) überprüft werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Elahi, M.M., Y.X. Kong, and B.M. Matata, *Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2009. **2**(5): p. 259-69.
2. Pitt, B., et al., *Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study*. *Circulation*, 2003. **108**(15): p. 1831-8.
3. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
4. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(10): p. 709-17.
5. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. *Science*, 1988. **240**(4854): p. 889-95.
6. Williams, J.S. and G.H. Williams, *50th anniversary of aldosterone*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(6): p. 2364-72.
7. Zennaro, M.C., et al., *Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(36): p. 21016-20.
8. Le Menuet, D., et al., *Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(11): p. 7878-86.
9. Viengchareun, S., et al., *The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology*. *Nucl Recept Signal*, 2007. **5**: p. e012.
10. Zennaro, M.C., et al., *A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action*. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(9): p. 1586-98.
11. Kwak, S.P., et al., *5'-Heterogeneity of the mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid: differential expression and regulation of splice variants within the rat hippocampus*. *Endocrinology*, 1993. **133**(5): p. 2344-50.
12. Fuse, H., H. Kitagawa, and S. Kato, *Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1)*. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(6): p. 889-99.
13. Tallec, L.P., et al., *Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification*. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(12): p. 2529-42.
14. Pascual-Le Tallec, L. and M. Lombes, *The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(9): p. 2211-21.
15. Pfau, A., et al., *Ca<sup>2+</sup> but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulates GRE-element activation by the human mineralocorticoid receptor in HEK cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **264**(1-2): p. 35-43.
16. Lim-Tio, S.S. and P.J. Fuller, *Intracellular signaling pathways confer specificity of transactivation by mineralocorticoid and glucocorticoid receptors*. *Endocrinology*, 1998. **139**(4): p. 1653-61.
17. Grossmann, C., et al., *Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(7): p. 1697-710.

18. Black, B.E., et al., *DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals*. *Curr Biol*, 2001. **11**(22): p. 1749-58.
19. Li, Y., et al., *Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor*. *Mol Cell*, 2005. **19**(3): p. 367-80.
20. Binart, N., M. Lombes, and E.E. Baulieu, *Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants*. *Biochem J*, 1995. **311 ( Pt 3)**: p. 797-804.
21. Grossmann, C., et al., *Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling*. *Chem Biol*, 2012. **19**(6): p. 742-51.
22. Odermatt, A., P. Arnold, and F.J. Frey, *The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 28484-92.
23. Trapp, T. and F. Holsboer, *Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action*. *Trends Pharmacol Sci*, 1996. **17**(4): p. 145-9.
24. McDonnell, D.P., et al., *The human progesterone receptor A-form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1994. **48**(5-6): p. 425-32.
25. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(3): p. 306-60.
26. Whitfield, G.K., et al., *Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function*. *J Cell Biochem*, 1999. **Suppl 32-33**: p. 110-22.
27. Baschant, U., N.E. Lane, and J. Tuckermann, *The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2012. **8**(11): p. 645-55.
28. Beato, M. and J. Klug, *Steroid hormone receptors: an update*. *Hum Reprod Update*, 2000. **6**(3): p. 225-36.
29. Yudt, M.R. and J.A. Cidlowski, *Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor*. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(7): p. 1093-103.
30. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. *Nature*, 1985. **318**(6047): p. 635-41.
31. Oakley, R.H., M. Sar, and J.A. Cidlowski, *The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(16): p. 9550-9.
32. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(5): p. 3177-84.
33. Lu, N.Z. and J.A. Cidlowski, *The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1024**: p. 102-23.
34. Hauk, P.J., et al., *Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **105**(4): p. 782-7.
35. Chikanza, I.C., *Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **966**: p. 39-48.
36. Vandevyver, S., L. Dejager, and C. Libert, *On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back*. *Traffic*, 2012. **13**(3): p. 364-74.
37. Hollenberg, N.K., *Aldosterone in the development and progression of renal injury*. *Kidney Int*, 2004. **66**(1): p. 1-9.
38. Rudolph, A.E., E.R. Blasi, and J.A. Delyani, *Tissue-specific corticosteroidogenesis in the rat*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. **165**(1-2): p. 221-4.
39. Hatakeyama, H., et al., *Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(39): p. 24316-20.

40. Takeda, Y., *Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **217**(1-2): p. 75-9.
41. Silvestre, J.S., et al., *Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 4883-91.
42. Gomez-Sanchez, E.P., et al., *Origin of aldosterone in the rat heart*. Endocrinology, 2004. **145**(11): p. 4796-802.
43. Fiebeler, A., et al., *Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage*. Circulation, 2005. **111**(23): p. 3087-94.
44. MacKenzie, S.M., J.M. Connell, and E. Davies, *Non-adrenal synthesis of aldosterone: a reality check*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **350**(2): p. 163-7.
45. Funder, J.W., *Aldosterone and mineralocorticoid receptors: a personal reflection*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 146-50.
46. Gekle, M. and C. Grossmann, *Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly?* Pflugers Arch, 2009. **458**(2): p. 231-46.
47. Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor*. Lancet, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
48. Funder, J.W., et al., *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated*. Science, 1988. **242**(4878): p. 583-5.
49. Lim-Tio, S.S., M.C. Keightley, and P.J. Fuller, *Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor*. Endocrinology, 1997. **138**(6): p. 2537-43.
50. Funder, J.W., *Enzymes and receptors: challenges and future directions*. Steroids, 1994. **59**(2): p. 164-9.
51. Bens, M., et al., *Corticosteroid-dependent sodium transport in a novel immortalized mouse collecting duct principal cell line*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(5): p. 923-34.
52. Horisberger, J.D., et al., *Structure-function relationship of Na,K-ATPase*. Annu Rev Physiol, 1991. **53**: p. 565-84.
53. Beesley, A.H., D. Hornby, and S.J. White, *Regulation of distal nephron K<sup>+</sup> channels (ROMK) mRNA expression by aldosterone in rat kidney*. J Physiol, 1998. **509 ( Pt 3)**: p. 629-34.
54. Ebata, S., et al., *Aldosterone activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms*. Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1400-12.
55. Miyata, Y., S. Muto, and E. Kusano, *Mechanisms for nongenomic and genomic effects of aldosterone on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in vascular smooth muscle cells*. J Hypertens, 2005. **23**(12): p. 2237-50.
56. Krug, A.W., et al., *Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders*. Pflugers Arch, 2003. **446**(4): p. 492-6.
57. Bhargava, A., et al., *The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action*. Endocrinology, 2001. **142**(4): p. 1587-94.
58. Chen, S.Y., et al., *Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2514-9.
59. Fakitsas, P., et al., *Early aldosterone-induced gene product regulates the epithelial sodium channel by deubiquitylation*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1084-92.
60. Ziera, T., et al., *Cnksr3 is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel*. FASEB J, 2009. **23**(11): p. 3936-46.
61. Soundararajan, R., et al., *A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 39970-81.
62. Naray-Fejes-Toth, A., P.M. Snyder, and G. Fejes-Toth, *The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na<sup>+</sup> transport*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(50): p. 17434-9.

63. Xu, B.E., et al., *WNK1 activates SGK1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and non-catalytic mechanism*. J Biol Chem, 2005. **280**(40): p. 34218-23.
64. Xu, B.E., et al., *WNK1 activates SGK1 to regulate the epithelial sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10315-20.
65. Good, D.W., T. George, and B.A. Watts, 3rd, *Aldosterone inhibits HCO absorption via a nongenomic pathway in medullary thick ascending limb*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(4): p. F699-706.
66. Mihailidou, A.S., M. Mardini, and J.W. Funder, *Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C*. Endocrinology, 2004. **145**(2): p. 773-80.
67. Gros, R., et al., *GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 442-51.
68. Losel, R. and M. Wehling, *Nongenomic actions of steroid hormones*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(1): p. 46-56.
69. Gekle, M., et al., *Rapid activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca<sup>2+</sup> and stimulation of a plasma membrane proton conductance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10500-4.
70. Markos, F., V. Healy, and B.J. Harvey, *Aldosterone rapidly activates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in M-1 cortical collecting duct cells via a PKC-MAPK pathway*. Nephron Physiol, 2005. **99**(1): p. p1-9.
71. Funder, J.W., *The nongenomic actions of aldosterone*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 313-21.
72. Maguire, D., et al., *Rapid responses to aldosterone in human distal colon*. Steroids, 1999. **64**(1-2): p. 51-63.
73. Schneider, S.W., et al., *Rapid aldosterone-induced cell volume increase of endothelial cells measured by the atomic force microscope*. Cell Biol Int, 1997. **21**(11): p. 759-68.
74. Grossmann, C. and M. Gekle, *New aspects of rapid aldosterone signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **308**(1-2): p. 53-62.
75. Christ, M., et al., *Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells*. Circulation, 1999. **99**(11): p. 1485-91.
76. Massaad, C., et al., *Modulation of human mineralocorticoid receptor function by protein kinase A*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(1): p. 57-65.
77. Le Moellic, C., et al., *Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC $\alpha$  activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(5): p. 1145-60.
78. Naray-Fejes-Toth, A., C. Boyd, and G. Fejes-Toth, *Regulation of epithelial sodium transport by promyelocytic leukemia zinc finger protein*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(1): p. F18-26.
79. Labeit, A.M., et al., *Changes in the prevalence, treatment and control of hypertension in Germany? A clinical-epidemiological study of 50.000 primary care patients*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52229.
80. Wang, H., et al., *Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2071-94.
81. Conn, J.W. and L.H. Louis, *Primary aldosteronism: a new clinical entity*. Trans Assoc Am Physicians, 1955. **68**: p. 215-31; discussion, 231-3.
82. Vasan, R.S., et al., *Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons*. N Engl J Med, 2004. **351**(1): p. 33-41.

83. Hannemann, A., et al., *Reference intervals for aldosterone, renin, and the aldosterone-to-renin ratio in the population-based Study of Health in Pomerania (SHIP-1)*. *Horm Metab Res*, 2010. **42**(6): p. 392-9.
84. Hamlyn, J.M., et al., *Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(14): p. 6259-63.
85. Tymiak, A.A., et al., *Physicochemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(17): p. 8189-93.
86. Neshar, M., et al., *Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(6): p. H2026-34.
87. Dostanic-Larson, I., et al., *The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na,K-ATPase plays a role in blood pressure regulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(44): p. 15845-50.
88. Manunta, P., B.P. Hamilton, and J.M. Hamlyn, *Salt intake and depletion increase circulating levels of endogenous ouabain in normal men*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **290**(3): p. R553-9.
89. Blaustein, M.P., et al., *How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **302**(5): p. H1031-49.
90. Wang, J.G., et al., *Salt, endogenous ouabain and blood pressure interactions in the general population*. *J Hypertens*, 2003. **21**(8): p. 1475-81.
91. Manunta, P., et al., *Endogenous ouabain and the renin-angiotensin-aldosterone system: distinct effects on Na handling and blood pressure in human hypertension*. *J Hypertens*, 2011. **29**(2): p. 349-56.
92. Scheiner-Bobis, G., *The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(10): p. 2424-33.
93. Blanco, G. and R.W. Mercer, *Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(5 Pt 2): p. F633-50.
94. Summa, V., et al., *Isoform specificity of human Na(+), K(+)-ATPase localization and aldosterone regulation in mouse kidney cells*. *J Physiol*, 2004. **555**(Pt 2): p. 355-64.
95. Golovina, V.A., et al., *Na<sup>+</sup> pump alpha 2-subunit expression modulates Ca<sup>2+</sup> signaling*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **284**(2): p. C475-86.
96. Zhang, J., et al., *Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice*. *J Physiol*, 2005. **569**(Pt 1): p. 243-56.
97. Keryanov, S. and K.L. Gardner, *Physical mapping and characterization of the human Na,K-ATPase isoform, ATP1A4*. *Gene*, 2002. **292**(1-2): p. 151-66.
98. Crambert, G., et al., *Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(3): p. 1976-86.
99. Tripodi, G., et al., *Steroid biosynthesis and renal excretion in human essential hypertension: association with blood pressure and endogenous ouabain*. *Am J Hypertens*, 2009. **22**(4): p. 357-63.
100. Bauer, N., et al., *Ouabain-like compound changes rapidly on physical exercise in humans and dogs: effects of beta-blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition*. *Hypertension*, 2005. **45**(5): p. 1024-8.
101. Linde, C.I., et al., *Nanomolar ouabain increases NCX1 expression and enhances Ca<sup>2+</sup> signaling in human arterial myocytes: a mechanism that links salt to increased vascular resistance?* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012. **303**(7): p. H784-94.
102. Juhaszova, M. and M.P. Blaustein, *Distinct distribution of different Na<sup>+</sup> pump alpha subunit isoforms in plasmalemma. Physiological implications*. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. **834**: p. 524-36.
103. Blaustein, M.P. and V.A. Golovina, *Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca(2<sup>+</sup>) stores*. *Trends Neurosci*, 2001. **24**(10): p. 602-8.
104. Kaplan, J.H., *Biochemistry of Na,K-ATPase*. *Annu Rev Biochem*, 2002. **71**: p. 511-35.

105. Blaustein, M.P. and J.M. Hamlyn, *Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na(+) pump, the Na(+)/Ca(2+) exchanger and TRPC proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1802**(12): p. 1219-29.
106. Liu, L., et al., *Comparative properties of caveolar and noncaveolar preparations of kidney Na+/K+-ATPase*. *Biochemistry*, 2011. **50**(40): p. 8664-73.
107. Haas, M., et al., *Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na+/K+-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(21): p. 18694-702.
108. Pulina, M.V., et al., *Upregulation of Na+ and Ca2+ transporters in arterial smooth muscle from ouabain-induced hypertensive rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(1): p. H263-74.
109. Xie, Z., *Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction*. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **986**: p. 497-503.
110. Liu, L., et al., *Association of PI3K-Akt signaling pathway with digitalis-induced hypertrophy of cardiac myocytes*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. **293**(5): p. C1489-97.
111. Schoner, W., *Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(10): p. 2440-8.
112. Bravo, E.L., R.C. Tarazi, and H.P. Dustan, *Multifactorial analysis of chronic hypertension induced by electrolyte-active steroids in trained, unanesthetized dogs*. *Circ Res*, 1977. **40**(5 Suppl 1): p. I140-5.
113. Cowley, A.W., Jr., *Long-term control of arterial blood pressure*. *Physiol Rev*, 1992. **72**(1): p. 231-300.
114. Duprez, D.A., *Aldosterone and the vasculature: mechanisms mediating resistant hypertension*. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2007. **9**(1 Suppl 1): p. 13-8.
115. Zhang, J., et al., *In vivo assessment of artery smooth muscle [Ca2+]i and MLCK activation in FRET-based biosensor mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(3): p. H946-56.
116. Radaelli, A., et al., *Adrenergic origin of very low-frequency blood pressure oscillations in the unanesthetized rat*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H357-64.
117. Osborn, J.W., V.A. Averina, and G.D. Fink, *Current computational models do not reveal the importance of the nervous system in long-term control of arterial pressure*. *Exp Physiol*, 2009. **94**(4): p. 389-96.
118. Meneton, P., et al., *Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(2): p. 679-715.
119. Huang, B.S., B.N. Van Vliet, and F.H. Leenen, *Increases in CSF [Na+] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(3): p. H1160-6.
120. Honda, K., et al., *The osmoreceptor complex in the rat: evidence for interactions between the supraoptic and other diencephalic nuclei*. *J Physiol*, 1990. **431**: p. 225-41.
121. Huang, B.S., et al., *Role of central nervous system aldosterone synthase and mineralocorticoid receptors in salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009. **296**(4): p. R994-R1000.
122. Andersson, B., et al., *Centrally mediated effects of sodium and angiotensin II on arterial blood pressure and fluid balance*. *Acta Physiol Scand*, 1972. **85**(3): p. 398-407.
123. Huang, B.S., et al., *Chronic central versus peripheral ouabain, blood pressure, and sympathetic activity in rats*. *Hypertension*, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1087-90.
124. Van Huysse, J.W., et al., *Hypertension from chronic central sodium chloride in mice is mediated by the ouabain-binding site on the Na,K-ATPase alpha(2)-isoform*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **301**(5): p. H2147-53.

125. Gabor, A. and F.H. Leenen, *Mechanisms in the PVN mediating local and central sodium-induced hypertension in Wistar rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009. **296**(3): p. R618-30.
126. Gomez-Sanchez, E.P., C. Fort, and D. Thwaites, *Central mineralocorticoid receptor antagonism blocks hypertension in Dahl S/JR rats*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 1): p. E96-9.
127. Schmidt, B.M., et al., *Interaction of rapid nongenomic cardiovascular aldosterone effects with the adrenergic system*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 761-7.
128. Go, W.Y., et al., *NFAT5/TonEBP mutant mice define osmotic stress as a critical feature of the lymphoid microenvironment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10673-8.
129. Yamamuro, M., et al., *Direct effects of aldosterone on cardiomyocytes in the presence of normal and elevated extracellular sodium*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1314-21.
130. Jernigan, N.L. and H.A. Drummond, *Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(4): p. F891-901.
131. Oberleithner, H., et al., *Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(41): p. 16281-6.
132. Cao, C., et al., *Chronic ouabain treatment induces vasa recta endothelial dysfunction in the rat*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(1): p. F98-F106.
133. Dietrich, A., H. Kalwa, and T. Gudermann, *TRPC channels in vascular cell function*. Thromb Haemost. **103**(2): p. 262-70.
134. Raina, H., et al., *Sympathetic nerves and the endothelium influence the vasoconstrictor effect of low concentrations of ouabain in pressurized small arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(6): p. H2093-101.
135. Elliott, S.J., J.G. Meszaros, and W.P. Schilling, *Effect of oxidant stress on calcium signaling in vascular endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 1992. **13**(6): p. 635-50.
136. Zhang, D.X. and D.D. Gutterman, *Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(2): p. 133-9.
137. Uhrenholt, T.R., et al., *Rapid inhibition of vasoconstriction in renal afferent arterioles by aldosterone*. Circ Res, 2003. **93**(12): p. 1258-66.
138. Iwashima, F., et al., *Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1009-14.
139. Nagata, D., et al., *Molecular mechanism of the inhibitory effect of aldosterone on endothelial NO synthase activity*. Hypertension, 2006. **48**(1): p. 165-71.
140. Panza, J.A., et al., *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 22-7.
141. Skott, O., et al., *Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease--friend or foe?* Pharmacol Ther, 2006. **111**(2): p. 495-507.
142. Mason, D.T. and E. Braunwald, *Studies on Digitalis. X. Effects of Ouabain on Forearm Vascular Resistance and Venous Tone in Normal Subjects and in Patients in Heart Failure*. J Clin Invest, 1964. **43**: p. 532-43.
143. Schoner, W. and G. Scheiner-Bobis, *Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(2): p. C509-36.
144. James, P.F., et al., *Identification of a specific role for the Na,K-ATPase alpha 2 isoform as a regulator of calcium in the heart*. Mol Cell, 1999. **3**(5): p. 555-63.
145. Pritchard, T.J., et al., *Transgenic mice expressing Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in smooth muscle decreases blood pressure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(2): p. H1172-82.

146. Xu, K.Y., et al., *Mechanistic distinction between activation and inhibition of (Na(+)+K(+))-ATPase-mediated Ca<sup>2+</sup> influx in cardiomyocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **406**(2): p. 200-3.
147. Kokubo, Y., et al., *Association of genetic polymorphisms of sodium-calcium exchanger 1 gene, NCX1, with hypertension in a Japanese general population*. Hypertens Res, 2004. **27**(10): p. 697-702.
148. Zulian, A., et al., *Upregulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca<sup>2+</sup> homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(3): p. H624-33.
149. Zannad, F., et al., *Rationale and design of the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF)*. Eur J Heart Fail, 2010. **12**(6): p. 617-22.
150. Zannad, F., et al., *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms*. N Engl J Med, 2010. **364**(1): p. 11-21.
151. Rocha, R., et al., *Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 451-8.
152. Brilla, C.G., et al., *Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension*. Circ Res, 1990. **67**(6): p. 1355-64.
153. Young, M., et al., *Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2578-83.
154. Young, M., G. Head, and J. Funder, *Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states*. Am J Physiol, 1995. **269**(4 Pt 1): p. E657-62.
155. Sun, Y., et al., *Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress*. Am J Pathol, 2002. **161**(5): p. 1773-81.
156. Rocha, R., et al., *Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1802-10.
157. Shibata, S., et al., *Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 355-64.
158. Fu, G.X., et al., *Aldosterone-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves MR, ERK, and p38 MAPK*. Endocrine, 2012. **42**(3): p. 676-83.
159. Rebsamen, M.C., et al., *Direct and indirect effects of aldosterone on cyclooxygenase-2 and interleukin-6 expression in rat cardiac cells in culture and after myocardial infarction*. Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3135-42.
160. Blasi, E.R., et al., *Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1791-800.
161. Schwerdt, G., et al., *Influence of aldosterone and salt or ouabain in a10 rat aorta smooth muscle cells*. J Vasc Res, 2012. **49**(3): p. 231-41.
162. Leopold, J.A., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(3): p. 411-7.
163. Gilbert, K.C. and N.J. Brown, *Aldosterone and inflammation*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(3): p. 199-204.
164. Leopold, J.A., et al., *Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 189-97.
165. Grossmann, C., et al., *Interaction between mineralocorticoid receptor and cAMP/CREB signaling*. Steroids, 2010. **75**(8-9): p. 539-43.
166. Grossmann, C., et al., *Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(6): p. E1790-800.
167. Jaffe, I.Z. and M.E. Mendelsohn, *Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **96**(6): p. 643-50.

168. Callera, G.E., et al., *c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2005. **46**(4): p. 1032-8.
169. Francois, H., et al., *Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 926-8.
170. Krug, A.W., et al., *Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 45892-7.
171. McEneaney, V., B.J. Harvey, and W. Thomas, *Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **107**(3-5): p. 180-90.
172. Fujisawa, G., et al., *Na/H exchange isoform 1 is involved in mineralocorticoid/salt-induced cardiac injury*. Hypertension, 2003. **41**(3): p. 493-8.
173. Young, M. and J. Funder, *Mineralocorticoid action and sodium-hydrogen exchange: studies in experimental cardiac fibrosis*. Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 3848-51.
174. Hirono, Y., et al., *Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension: the possible role of local renin-angiotensin system*. Endocrinology, 2007. **148**(4): p. 1688-96.
175. Hayashi, H., et al., *Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis*. Hypertens Res, 2008. **31**(2): p. 363-75.
176. Bokemeyer, D., U. Schmitz, and H.J. Kramer, *Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 549-58.
177. Funder, J.W., *Relative aldosterone excess: relative to what?* Hypertension, 2005. **46**(4): p. 643-4.
178. Rochette-Egly, C., *Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription*. J Biol Chem, 2005. **280**(38): p. 32565-8.
179. O'Malley, B.W., *Coregulators: from whence came these "master genes"*. Mol Endocrinol, 2007. **21**(5): p. 1009-13.
180. Yang, J. and M.J. Young, *The mineralocorticoid receptor and its coregulators*. J Mol Endocrinol, 2009. **43**(2): p. 53-64.
181. Bookout, A.L., et al., *Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network*. Cell, 2006. **126**(4): p. 789-99.
182. Funder, J.W., *GPR30, mineralocorticoid receptors, and the rapid vascular effects of aldosterone*. Hypertension, 2011. **57**(3): p. 370-2.
183. Cato, A.C., A. Nestl, and S. Mink, *Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways*. Sci STKE, 2002. **2002**(138): p. re9.
184. Lange, C.A., *Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word?* Mol Endocrinol, 2004. **18**(2): p. 269-78.
185. Arriza, J.L., et al., *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor*. Science, 1987. **237**(4812): p. 268-75.
186. Seeler, J.S. and A. Dejean, *Nuclear and unclear functions of SUMO*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 690-9.
187. Ruhs, S., et al., *Modulation of transcriptional mineralocorticoid receptor activity by nitrosative stress*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(5): p. 1088-100.
188. Duma, D., J.E. Silva-Santos, and J. Assreuy, *Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats*. Crit Care Med, 2004. **32**(11): p. 2304-10.
189. Nagase, M., et al., *Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1*. Hypertension, 2012. **59**(2): p. 500-6.

190. Newfell, B.G., et al., *Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(8): p. 1871-80.
191. Rahman, M., et al., *Effects of adrenomedullin on cardiac oxidative stress and collagen accumulation in aldosterone-dependent malignant hypertensive rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **318**(3): p. 1323-9.
192. Gekle, M., et al., *Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone*. *Pflugers Arch*, 2007. **454**(3): p. 403-13.
193. Kagawa, C.M., *Blocking the renal electrolyte effects of mineralocorticoids with an orally active steroidal spiro lactone*. *Endocrinology*, 1960. **67**: p. 125-32.
194. Funder, J. and K. Myles, *Exclusion of corticosterone from epithelial mineralocorticoid receptors is insufficient for selectivity of aldosterone action: in vivo binding studies*. *Endocrinology*, 1996. **137**(12): p. 5264-8.
195. Funder, J.W., *The case against aldosterone: not proven*. *Endocrine*, 2012. **42**(3): p. 464-5.
196. Ward, M.R., et al., *Eplerenone suppresses constrictive remodeling and collagen accumulation after angioplasty in porcine coronary arteries*. *Circulation*, 2001. **104**(4): p. 467-72.
197. Rickard, A.J., et al., *The role of the glucocorticoid receptor in mineralocorticoid/salt-mediated cardiac fibrosis*. *Endocrinology*, 2006. **147**(12): p. 5901-6.
198. Hafezi-Moghadam, A., et al., *Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase*. *Nat Med*, 2002. **8**(5): p. 473-9.
199. Kimes, B.W. and B.L. Brandt, *Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta*. *Exp Cell Res*, 1976. **98**(2): p. 349-66.
200. Krozowski, Z.S. and J.W. Funder, *Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(19): p. 6056-60.
201. Rupprecht, R., et al., *Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands*. *Eur J Pharmacol*, 1993. **247**(2): p. 145-54.
202. Brennan, F.E. and P.J. Fuller, *Rapid upregulation of serum and glucocorticoid-regulated kinase (sgk) gene expression by corticosteroids in vivo*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. **166**(2): p. 129-36.
203. Brown, N.J., et al., *Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. **85**(1): p. 336-44.
204. He, F.J., et al., *Plasma sodium: ignored and underestimated*. *Hypertension*, 2005. **45**(1): p. 98-102.
205. Lynch, R.M., et al., *Clearance of store-released Ca<sup>2+</sup> by the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger is diminished in aortic smooth muscle from Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alpha 2-isoform gene-ablated mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **294**(3): p. H1407-16.
206. Shelly, D.A., et al., *Na<sup>(+)</sup> pump alpha 2-isoform specifically couples to contractility in vascular smooth muscle: evidence from gene-targeted neonatal mice*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(4): p. C813-20.
207. Funder, J., *Mineralocorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001. **28**(12): p. 1002-6.
208. Epstein, M., *Aldosterone as a mediator of progressive renal disease: pathogenetic and clinical implications*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **37**(4): p. 677-88.
209. Epstein, M., *Aldosterone as a determinant of cardiovascular and renal dysfunction*. *J R Soc Med*, 2001. **94**(8): p. 378-83.
210. Bauersachs, J., et al., *Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular*

- superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression.* J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 351-8.
211. Rupperecht, R., et al., *Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor.* Mol Endocrinol, 1993. **7**(4): p. 597-603.
212. Mihailidou, A.S., et al., *Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction.* Hypertension, 2009. **54**(6): p. 1306-12.
213. Young, M.J., et al., *Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation.* Endocrinology, 2003. **144**(3): p. 1121-5.
214. Guder, G., et al., *Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure.* Circulation, 2007. **115**(13): p. 1754-61.
215. Alzamora, R., L. Michea, and E.T. Marusic, *Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries.* Hypertension, 2000. **35**(5): p. 1099-104.
216. Funder, J.W., *Mineralocorticoid receptors and cardiovascular damage: it's not just aldosterone.* Hypertension, 2006. **47**(4): p. 634-5.
217. Montezano, A.C., et al., *Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(8): p. 1511-8.
218. Wang, H., et al., *Paradoxical mineralocorticoid receptor activation and left ventricular diastolic dysfunction under high oxidative stress conditions.* J Hypertens, 2008. **26**(7): p. 1453-62.
219. Johar, S., et al., *Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase.* FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1546-8.
220. Kobayashi, N., et al., *Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts.* Hypertension, 2006. **47**(4): p. 671-9.
221. Nagata, K., et al., *Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats.* Hypertension, 2006. **47**(4): p. 656-64.
222. Nakano, S., et al., *Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats.* Hypertens Res, 2005. **28**(11): p. 925-36.
223. Stas, S., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling.* Endocrinology, 2007. **148**(8): p. 3773-80.
224. Kayes-Wandover, K.M. and P.C. White, *Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(7): p. 2519-25.
225. Lombes, M., et al., *Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart.* Circulation, 1995. **92**(2): p. 175-82.
226. Slight, S.H., et al., *High affinity NAD(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart.* J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(4): p. 781-7.
227. Sheppard, K.E. and D.J. Autelitano, *11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 transforms 11-dehydrocorticosterone into transcriptionally active glucocorticoid in neonatal rat heart.* Endocrinology, 2002. **143**(1): p. 198-204.
228. Diaz, R., R.W. Brown, and J.R. Seckl, *Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions.* J Neurosci, 1998. **18**(7): p. 2570-80.

229. Brilla, C.G. and K.T. Weber, *Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis*. J Lab Clin Med, 1992. **120**(6): p. 893-901.
230. Rotte, A., et al., *Influence of dexamethasone on  $Na^+/H^+$  exchanger activity in dendritic cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(2): p. 305-14.
231. Webster, J.C., et al., *Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6865-70.
232. Mu, S., et al., *Epigenetic modulation of the renal beta-adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension*. Nat Med, 2012. **17**(5): p. 573-80.
233. Yang, C.L., X. Zhu, and D.H. Ellison, *The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is regulated by a WNK kinase signaling complex*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3403-11.
234. Ring, A.M., et al., *WNK4 regulates activity of the epithelial  $Na^+$  channel in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4020-4.
235. Cai, T.Q., et al., *Induction of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 but not -2 in human aortic smooth muscle cells by inflammatory stimuli*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001. **77**(2-3): p. 117-22.
236. Yang, S. and L. Zhang, *Glucocorticoids and vascular reactivity*. Curr Vasc Pharmacol, 2004. **2**(1): p. 1-12.
237. Draper, N. and P.M. Stewart, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action*. J Endocrinol, 2005. **186**(2): p. 251-71.
238. Tsugita, M., et al., *Differential regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 and -2 gene transcription by proinflammatory cytokines in vascular smooth muscle cells*. Life Sci, 2008. **83**(11-12): p. 426-32.
239. Yu, Z.Y., et al., *A qualitative comparison of the glucocorticoid receptor in cytosol from human brain and rat brain*. Brain Res, 1981. **223**(2): p. 325-33.
240. Rao, R.S., et al., *The A10 cell line: a model for neonatal, neointimal, or differentiated vascular smooth muscle cells?* Cardiovasc Res, 1997. **36**(1): p. 118-26.
241. Bochaton-Piallat, M.L., et al., *Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(6): p. 815-20.
242. O'Brien, W.J., J.B. Lingrel, and E.T. Wallick, *Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate*. Arch Biochem Biophys, 1994. **310**(1): p. 32-9.
243. Wang, J., et al., *All human  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase alpha-subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(4): p. C1336-43.
244. Muller-Ehmsen, J., et al., *Ouabain and substrate affinities of human  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase alpha(1)beta(1), alpha(2)beta(1), and alpha(3)beta(1) when expressed separately in yeast cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(4): p. C1355-64.
245. Katz, A., et al., *Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19582-92.
246. Méndez-Vilas, A., *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. 2012. **VOL. 2**(Quantitative Imaging of Intracellular Sodium): p. 119-129.
247. Beato, M., *Transcriptional regulation of mouse mammary tumor virus by steroid hormones*. Crit Rev Oncog, 1991. **2**(3): p. 195-210.
248. Beato, M., *Gene regulation by steroid hormones*. Cell, 1989. **56**(3): p. 335-44.

## 7 Thesen

### **MR und dessen Aktivitätsmodulation durch NaCl/ Mannit:**

- Die mittels biologisch relevanter Aldosteronkonzentrationen induzierte hMR-Aktivität in HEK-293-Zellen wird spezifisch durch NaCl positiv moduliert.
- Dieser modulierende NaCl-Effekt ist zeitabhängig und tritt verzögert auf.
- Die Zunahme der extrazellulären Osmolalität führt zu einer MR-Aktivierung.
- A10 Zellen exprimieren einen endogenen MR, der sich jedoch nicht durch Kortikosteroide aktivieren lässt und somit funktionell inaktiv ist.
- Die hMR-Aktivität wird im Gegensatz zu den HEK-293-Zellen in den A10-Zellen nicht durch NaCl/ Mannit moduliert.

### **GR und dessen Aktivitätsmodulation durch NaCl/ Mannit:**

- Veränderungen der extrazellulären Osmolalität aktivieren den hGR.
- NaCl hat über den Osmolalitätseffekt hinaus eine stimulierende Wirkung auf die maximale Rezeptoraktivität des hGR.
- Der endogene GR der A10 Zellen hat eine höhere Affinität für Hydrokortison als der endogene GR der HEK-293-Zellen.
- Die Aktivität des endogenen GR der HEK-293- und der A10 Zellen wird nicht durch NaCl/ Mannit moduliert.
- Die hGR-Aktivität wird im Gegensatz zu den HEK-293-Zellen in den A10 Zellen nicht durch NaCl/ Mannit moduliert.

### **Interaktion von Ouabain und MR**

- Physiologisch und pathophysiologisch relevante Ouabainkonzentrationen modulieren nicht die Aktivität des hMR und des endogenen GR in HEK-293- und A10-Zellen.
- Pathophysiologisch relevante Ouabainkonzentrationen steigern geringfügig die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration in HEK-293-Zellen und könnten somit einen Einfluss auf die Ca<sup>2+</sup>-Signalgebung und die pathologische MR-Aktivierung haben.
- Pathophysiologisch relevante Ouabainkonzentrationen induzieren einen Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen und könnten darüber die MR-Aktivität hemmen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

**Name:** Tim Hilgenfeld  
**Geburtstag:** 15.07.1986  
**Geburtsort:** Beeskow

## Werdegang:

**seit 06/2013** Arzt in Weiterbildung in der Abteilung für Neuroradiologie des Universitätsklinikums der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

**09/2010 - 11/2012** Begabtenstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

**10/2006 - 11/2012** Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**08/1999 - 06/2006** Abitur am Rouanet Gymnasium Beeskow

---

Tim Hilgenfeld

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Tim Hilgenfeld

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass diese Dissertation meinen ersten Promotionsversuch darstellt und an anderen Universitäten kein weiteres Promotionsverfahren gegen meine Person erfolgt.

---

Tim Hilgenfeld

## Danksagung

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Prof. Michael Gekle für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung und die stets offene Tür, auch bei Fragen und Problemen bedanken. Außerdem gilt mein Dank Frau Dr. Stefanie Ruhs für die thematische Einführung und die Betreuung während aller Phasen der Promotion.

Frau Sigrid Mildenberger, Frau Katja Quarch und Frau Nicole Strätz danke ich für die Einarbeitung in die labortechnischen Abläufe. Dem gesamten Team des Julius-Bernstein-Institutes für Physiologie möchte ich für die herausragende Arbeitsatmosphäre und unzähligen Hinweise danken, die die Doktorarbeit zu einem so spannenden und unvergesslichen Erlebnis machten.

Bei Frau Stefanie Amelung und meinen Eltern bedanke ich mich für ihre Unterstützung, das Korrekturlesen und die fortwährende Motivation während der gesamten Dauer der Promotion.