

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

## **Modulation der genomischen Aktivität des Mineralokortikoidrezeptors durch Stickstoffmonoxid-basierenden Radikalstress**

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

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

von Kathleen Schlör  
geboren am 13.07.1985 in Halle (Saale)

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Gekle  
Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer  
Prof. Dr. med. Tilmann Volk

07.03.2017

03.11.2017

## Referat

Der Mineralokortikoidrezeptor ist im aktivierten Zustand an der Regulation des Elektrolyt-/Volumenhaushaltes sowie an der Blutdruckregulation beteiligt. Abseits dieser physiologischen Wirkungen fördert er im kardioresnovaskulären System pathophysiologische Prozesse wie Inflammation, Fibrose und Hypertrophie, welche die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität negativ beeinflussen. Höchstwahrscheinlich sind für die schädliche Rezeptor-Aktivierung gewisse Umgebungsbedingungen notwendig. Ein möglicher Faktor sind reaktive Stickstoffspezies, welche ebenso mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert werden. Dabei wird die Protein-Tyrosin-Nitrierung als Marker vermehrten nitrosativen Stresses anerkannt.

Es erfolgte zunächst die Charakterisierung des Stickstoffmonoxid-Donors SNAP (S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin) und des Peroxynitrit-Bildners Sin-1 (3-Morpholinonydnonimin) hinsichtlich der Freisetzung von Stickstoffmonoxid und der Fähigkeit zur Protein-Tyrosin-Nitrierung als Hinweis auf die in vitro-Erzeugung nitrosativen Stresses. Zudem wurde in einem heterologen Expressionssystem mit einem Reportergenkonstrukt die Beeinträchtigung der genomischen Aktivität des humanen Mineralokortikoidrezeptors durch nitrosativen Stress in Form von Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) untersucht. Hierbei kamen auch trunkierte, d.h. gekürzte Rezeptorvarianten zum Einsatz, um den Wirkort von Peroxynitrit am Mineralokortikoidrezeptor näher zu bestimmen. Zusätzlich wurde der Mineralokortikoidrezeptor auf Proteinebene als direktes Ziel einer durch Peroxynitrit verursachten Tyrosin-Nitrierung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die gewählten Konzentrationen an Sin-1 und SNAP relevante Mengen an Stickstoffmonoxid freisetzen. Durch die zusätzliche Freisetzung von Superoxid-Anionen führt Sin-1 zur Bildung von Peroxynitrit, welches die Bildung von 3-Nitro-Tyrosin fördert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nitrosativer Stress, im Speziellen Peroxynitrit, in der Lage ist, den Mineralokortikoidrezeptor auch unabhängig von einer Liganden-Bindung zu aktivieren. Die A/B-Domäne des Rezeptors scheint ein möglicher Angriffsort von Peroxynitrit zu sein. Der direkte Protein-Nachweis einer 3-Nitro-Tyrosin-Bildung am Mineralokortikoidrezeptor als posttranslationale Proteinmodifikation durch Peroxynitrit gelang nicht. Schlussfolgernd besitzt nitrosativer Stress eine Bedeutung bei der Liganden-unabhängigen Aktivierung des Mineralokortikoidrezeptors und trägt somit möglicherweise zu dem pathologischen Umgebungsmilieu bei, das eine inadäquate Mineralokortikoidrezeptor-Aktivierung fördert.

Schlör, Kathleen: Modulation der genomischen Aktivität des Mineralokortikoidrezeptors durch Stickstoffmonoxid-basierenden Radikalstress, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2017

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mineralokortikoidrezeptor (MR) .....	1
1.1.1 Genstruktur des MR.....	2
1.1.2 Proteinstruktur des MR .....	2
1.1.3 Funktionsweise des MR .....	3
1.1.4 Posttranslationale Modifikationen des MR .....	4
1.1.5 Mineralokortikoid-Selektivität.....	5
1.2 Aldosteron .....	7
1.3 Signalgebung von Aldosteron/MR.....	7
1.3.1 Klassische, epitheliale, genomische Aldosteron/MR-Wirkungen.....	7
1.3.2 Nicht-genotrope Aldosteron/MR-Wirkungen.....	10
1.3.3 Nicht-epitheliale, nicht-klassische Mechanismen der Aldosteron/MR-Wirkung .....	12
1.4 Stickstoffmonoxid (NO) und Radikalstress .....	13
1.4.1 NO-Bildung.....	14
1.4.2 Diffusions- und Signaleigenschaften von NO.....	14
1.4.3 Funktionsvielfalt von NO .....	15
1.4.4 Zytotoxische Bedeutung von NO: Charakterisierung von RNS und ROS .....	16
1.4.5 Physiologische Entstehung und Bedeutung von RNS/ROS .....	17
1.4.6 Der RNS-„Fußabdruck“: Protein-Tyrosin-Nitrierung.....	18
1.4.7 Pathophysiologische RNS/ROS-Auswirkungen .....	19
1.4.8 RNS/ROS und Aldosteron/MR .....	21
<b>2. Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>22</b>
<b>3. Materialien und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1 Materialien.....	23
3.2 Zellbiologische Methoden .....	23
3.2.1 Verwendete Zell-Linien.....	23
3.2.2 Zellkultivierung .....	23
3.2.3 Transiente Zelltransfektion.....	24
3.2.4 Verwendete Plasmide für die transienten Transfektionen .....	24
3.3 Proteinbiochemische Methoden .....	24
3.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten.....	24
3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes .....	25
3.3.3 Reporter-Gen-Assay.....	26

3.3.4	SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western Blot .....	28
3.3.5	ELISA (Enzyme linked Immuno sorbent Assay) .....	31
3.4	Bestimmung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung und Peroxynitrit-Bildung .....	32
3.4.1	Nitrit-Assay mittels Griess-Reaktion .....	32
3.4.2	Antikörpervermittelte Nitro-Tyrosin-Detektion als Hinweis für Peroxynitrit-Bildung .....	32
3.5	Statistische Auswertung .....	33
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
4.1	Darstellung des humanen Mineralokortikoidrezeptors (hMR) auf Proteinebene .....	34
4.1.1	Darstellung des hMR auf Proteinebene in HEK293-Zellen nach Transfektion .....	34
4.1.2	Darstellung des hMR auf Proteinebene in OK-Zellen nach Transfektion .....	36
4.1.3	GRE-SEAP-Aktivierbarkeit von OK-Zellen und endogene Steroidrezeptoren .....	36
4.1.4	GRE-SEAP-Aktivierbarkeit transfizierter OK-Zellen mit dem humanen Mineralokortikoid- bzw. humanen Glukokortikoidrezeptor .....	37
4.1.5	Dosis-Antwort-Beziehung der GRE-SEAP-Aktivierung durch Aldosteron und Dexamethason .....	38
4.2	NO-Bildung und Peroxynitrit-Freisetzung durch Sin-1 bzw. SNAP .....	40
4.2.1	NO- bzw. Nitrit-Bestimmung im Nitrit-Assay .....	40
4.2.2	Bestimmung der Peroxynitrit-Bildung mit monoklonalem 3-Nitro-Tyrosin-Antikörper ..	41
4.2.3	Beeinflussung der Proteinmenge durch Zugabe der beiden Radikal-Donoren Sin-1 bzw. SNAP .....	42
4.2.4	Quantitative Beeinflussung des humanen Mineralokortikoidrezeptors durch Anwesenheit von Sin-1 und SNAP .....	43
4.3	Wirkung von Sin-1 und SNAP auf die GRE-SEAP-Aktivität .....	44
4.3.1	Einfluss der Radikal-Donoren Sin-1 und SNAP auf nicht-hMR-transfizierte OK-Zellen ...	44
4.3.2	Einfluss von SNAP auf die hMR-Transaktivierungsaktivität in OK-Zellen .....	45
4.3.3	Einfluss von Sin-1 auf die hMR-Transaktivierungsaktivität in OK-Zellen .....	48
4.3.4	Einfluss von Sin-1 und SNAP sowie Dexamethason auf den hGR in OK-Zellen .....	51
4.3.5	Domänen-abhängige Beeinflussung der hMR-Transaktivierungsaktivität in OK-Zellen...	52
4.4	Protein-Tyrosin-Nitrierung.....	54
4.4.1	Protein-Tyrosin-Nitrierung in OK-Zellen .....	54
4.4.2	Protein-Tyrosin-Nitrierung in HEK293-Zellen .....	55
4.4.3	Protein-Tyrosin-Nitrierung in Zell-Lysaten mittels Sin-1 bzw. SNAP .....	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>58</b>
5.1	Der nitrosative Stress im experimentellen Modell .....	58
5.2	Der Umgang mit unterschiedlichen Zell-Linien: OK bzw. HEK293 .....	58

---

5.3	Einfluss von NO auf die transkriptionelle hMR-Aktivität .....	59
5.4	Einfluss von Peroxynitrit auf die transkriptionelle hMR-Aktivität .....	61
5.5	Einfluss von NO und Peroxynitrit auf die transkriptionelle hGR-Aktivität.....	62
5.6	Einfluss von Peroxynitrit auf die A/B-Domäne des hMR .....	63
5.7	Die Tyrosin-Nitrierung: Der Fußabdruck durch nitrosativen Stress .....	64
5.8	Perspektiven .....	65
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>Thesen .....</b>	<b>80</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2
$^{\circ}\text{C}$	Temperatur in Grad Celcius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	<i>activation function domain</i>
AP1	Aktivator-Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AT1-Rezeptor	Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BH4	Tetrahydrobiopterin
Bis	Methylenbisacrylamid
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
CHIF	<i>channel-inducing factor</i>
$\text{Cl}^-$	Chlorid-Ion
cm	Zentimeter
$\text{cm}^2$	Quadratzentimeter
CNK3	<i>connector enhancer of kinase suppressor of Ras-3</i>
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
$\text{CO}_3^{\cdot-}$	Carbonat-Radikal
cSRC	<i>cellular steroid receptor coactivator</i>

Cu <sup>+</sup>	einwertiges Kupfer-Ion
Cu <sup>2+</sup>	zweiwertiges Kupfer-Ion
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
Cu/Zn-SOD	Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase
DAG	Diacylglycerol
DBD	DNA-bindende Domäne
dh.	das heißt
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDRF	<i>endothelial derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-2	Elongationsfaktor 2
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immuno sorbent Assay
ELL	<i>eleven-nineteen lysine-rich leukemia</i>
ENaC	epithelialer Natrium-Kanal ( <i>epithelial Na<sup>+</sup>-channel</i> )
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase = NOS3
EPHESUS	<b>E</b> plerenone Neuro <b>h</b> ormonal <b>E</b> fficiacy and <b>S</b> urvival <b>S</b> tudy
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
et al.	et alii
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAF	<i>Fas-associated factor 1</i>
FCS	fetales Kälberserum
FMN	Flavin-Mononukleotid
g	Erdanziehungskraft
GILZ	Glukokortikoid-induziertes Leuzin Zipper Protein
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	Glukokortikoid-responsives Element
h	Stunde/n
H <sup>+</sup>	Wasserstoff-Ion
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>

hGR	humaner Glukokortikoidrezeptor
hMR	humaner Mineralokortikoidrezeptor
HO·	Hydroxyl-Radikal
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HOCl	hypochlorige Säure
HRE	Hormon-responsives Element
HRP	Meerrettich-Peroxidase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
hsp	<i>heat shock protein</i>
i.c.	intrazellulär
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG	Immunglobulin G
iNOS	<i>inducible</i> / induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase = NOS2
IP3 (-Kinase)	Inositol-Triphosphat (-Kinase)
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K-ras2A	<i>Kirsten ras 2A</i>
K-WNK1	<i>kidney specific with no lysine kinase 1</i>
l	Liter
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MEK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar



Mn-SOD	Mangan-abhängige-Superoxid-Dismutase
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MRE	Mineralokortikoid-responsives Element
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidierte Form
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid(-Phosphat), reduzierte Form
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit
NaOH	Natriumhydroxid
NCC	Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> -Kotransporter
Nedd	<i>neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein</i>
NES	Nukleäres Export-Signal
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NF-YC	<i>nuclear transcription factor</i>
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher
NLS	Nukleäre Lokalisationssequenz
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase = NOS1
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NO <sup>+</sup>	Nitrosonium-Kation
NO <sup>-</sup>	Nitroxyl-Anion
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Stickstoffdioxid-Radikal
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NTD	N-terminale Domäne
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
OK	<i>opossum kidney cells</i>

ONOO <sup>-</sup>	Peroxyinitrit
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
p	p-Wert; Überschreitungswahrscheinlichkeit
p38	mitogenaktivierte Proteinkinase 38
PAI	Plasminogen Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PIAS	<i>protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription</i>
pK <sub>a</sub>	Säurestärke
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PTM	posttranslationale Modifikationen
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RALES	<b>R</b> andomized <b>A</b> ldactone <b>E</b> valuation <b>S</b> tudy
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> / reaktive Stickstoff-Spezies
ROMK	<i>rat outer medullary K<sup>+</sup>-channel</i>
ROO <sup>-</sup>	Lipid-Radikal
ROS	<i>reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoff-Spezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEAP	Sekretorische Alkalische Phosphatase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SERCA2a	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SGK-1	Serum- und Glukokortikoid-regulierte Protein-Kinase 1
Sin-1	3-Morpholinosydnonimin
SNAP	S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin
sog.	sogenannte/r
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF-β1	<i>transforming growth factor β1</i>

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsg101	Tumor Suppressor Gen 101
Ubc 9	<i>ubiquitin-conjugating enzyme 9</i>
u.a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
Usp2-45	<i>ubiquitin-specific protease 2-45</i>
usw.	und so weiter
u.v.a.	und viele andere
v.a.	vor allem
vs.	versus
VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
WB	Western Blot
z.B.	zum Beispiel
ZnCl <sub>2</sub>	Zinkchlorid
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

# 1. Einleitung

Seit der erstmaligen Isolation des mineralokortikoiden Hormons Aldosteron im Jahr 1953 durch Simpson et al. (1) aus über 500 kg boviner Nebenniere und der erstmaligen Klonierung des zugehörigen Steroidhormonrezeptors, dem Mineralokortikoidrezeptor (MR), durch Arriza et al. 1987 (2) liegen mehrere Jahrzehnte intensiver Forschung zur detaillierten Aufklärung der Wirkungs- und Funktionsweise von Aldosteron und des MR. Sehr zeitig konnte beiden die Regulation der Elektrolyt- und Wasser-Homöostase als „klassische“ Aufgabe v.a. im distalen Nephron der Niere und im Colon zugeschrieben werden (3;4). Abseits der klassischen Wirkungen wächst die Bedeutung der „nicht-klassischen“ Wirkungen von Aldosteron/MR, die vornehmlich Herz, Niere, Gefäße und das Gehirn betreffen. Die MR-Aktivierung, die nicht unbedingt mit einem erhöhten Aldosteron-Spiegel einhergehen muss, führt über proinflammatorische und profibrotische Prozesse zur Aufrechterhaltung und Progression von Endorganschädigung mit bspw. Blutdruckerhöhung, Herzhypertrophie und kardio-vaskulär-renalem Remodelling (5). Die klinische Bedeutung einer pathologischen MR-Aktivierung konnte durch die RALES- (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) und EPHEsus- (*Eplerenone Neurohormonal Efficacy and Survival Study*) Studien demonstriert werden: Demnach profitieren Postmyokardinfarkt-Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant von einer medikamentösen MR-Blockade (6;7). Durch Spironolakton bzw. Eplerenon verbesserte sich das Studienoutcome und führte zu reduzierter Morbidität und Mortalität. Damit haben der MR und seine medikamentös induzierte Blockade eine immense Wichtigkeit erhalten und den Schritt in die tägliche klinische Praxis nach aktueller leitliniengerechter Behandlung (8) herzinsuffizienter Patienten vollzogen. Weiterführende Untersuchungen weisen immer mehr Verflechtungen des MR mit anderen Signalkaskaden nach, weshalb die Komplexität der MR/Aldosteron-Aktivität Raum für viele neue Forschungsansätze lässt (4;5;9-14).

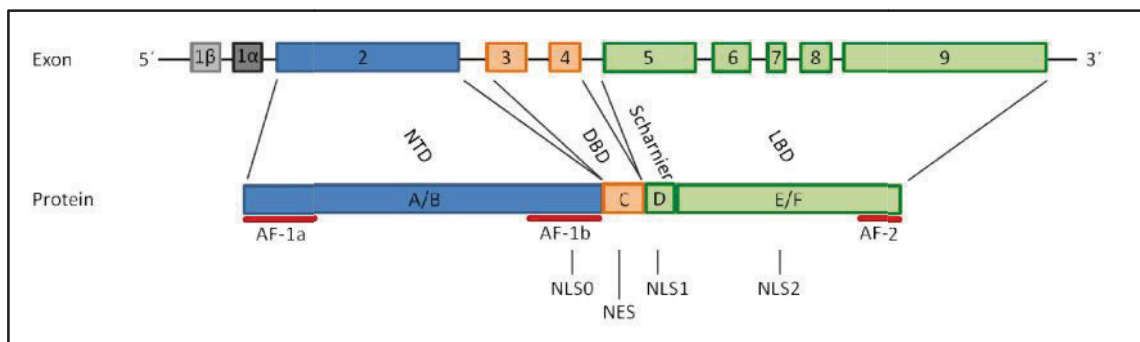
## **1.1 Mineralokortikoidrezeptor (MR)**

Der Mineralokortikoidrezeptor ist als Liganden-abhängiger Transkriptionsfaktor (2) ein Mitglied der Superfamilie der nukleären Rezeptoren (15). Der MR bildet zusammen mit dem Glukokortikoidrezeptor (GR) (16), Thyroidrezeptor (17), Retinsäurerezeptor (18) und dem Vitamin D-Rezeptor (19) die Subfamilie der Steroid-Thyroid-Hormonrezeptoren (20). Hauptsächlich wird der MR in polarisierten epithelialen Geweben exprimiert, wie z.B. distales Nephron und Colon, wo er an der Regulation Aldosteron-induzierter Gene beteiligt ist (21). Aber auch in nicht-epithelialen Geweben, wie Hippocampus, Hypothalamus, Kardiomyozyten und Adipozyten konnte eine MR-Expression nachgewiesen werden (22;23). Der MR spielt eine zentrale Rolle in

der Salz- und Volumen-Homöostase und der damit einhergehenden physiologischen Blutdruckregulation (2). Die Bedeutung wird in MR-knockout-Maus-Modellen deutlich, die ein massives und letal verlaufendes Salzverlust-Syndrom aufweisen (24).

### 1.1.1 Genstruktur des MR

Das den humanen Mineralokortikoidrezeptor (hMR) kodierende Gen heißt NR3C2 (2;25), liegt auf dem längeren Arm des Chromosoms 4 in der Region q31.1-q31.2, ist ca. 450 Kilobasenpaare lang und besteht aus insgesamt 10 Exons (26-28). Die Exons 2 bis 9 kodieren für das hMR-Protein mit einer Länge von 984 Aminosäuren (Abb. 1) (26;27). Die ersten beiden 5'-Exons (1 $\alpha$  und 1 $\beta$ ) werden dagegen nicht translatiert (26), sondern dienen der Transkriptstabilität und Translationseffizienz (15). Die alternative Transkription der Exons 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  führt zu zwei unterschiedlichen mRNA-Isoformen: hMR $\alpha$  und hMR $\beta$  (15;26;29). Die 5'-Exons 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  entsprechen den zwei Promotoren P1 (proximal) und P2 (distal) (30), wobei P1 in allen Aldosteron-Zielgeweben vorkommt, während P2 wahrscheinlich in spezifischen Entwicklungsstadien oder unter bestimmten physiologischen Umständen exprimiert wird (31).



**Abb. 1:** Schematischer Aufbau des hMR auf DNA- (Exon) und Protein-Ebene (abgewandelt nach (22))

### 1.1.2 Proteinstruktur des MR

Der hMR ist ein 107 kDa großes Polypeptid und besteht aus 3 funktionellen Domänen mit einer zwischengeschalteten Gelenkregion (Abb. 1) (2;20). Die **(1) N-terminale Domäne (NTD oder A/B-Domäne)** wird v.a. durch Exon 2 des MR-Gens kodiert und beinhaltet beim Menschen 2 verschiedene, konstitutive Transaktivierungsdomänen, sog. *activation function domains*: AF-1a und AF-1b (15;32). Desweiteren gibt es eine dazwischen liegende zentrale Domäne (AS 163-437), die eine intrinsische inhibitorische Funktion besitzt (32). Die inhibitorische Domäne ist ausreichend, um die gesamte Transaktivierungsstärke der N-Terminalen Domäne abzuschwächen (22;32;33). Die *activation function domains* sind verantwortlich für die Liganden-unabhängige Transaktivierung oder Unterdrückung des MR, wobei diverse Koregulatoren involviert sind und Interaktionen zur Liganden-bindenden Domäne (LBD) stattfinden. Zusätzlich

enthält die NTD die nukleäre Lokalisationssequenz NLS0 (34). Mit weniger als 15% Homologie zwischen der NTD des MR und denen anderer Steroidhormonrezeptoren wird die NTD des MR als Hauptdeterminante der MR-Spezifität angenommen (15;35).

Die **(2) DNA-bindende Domäne (DBD oder C-Domäne)** des MR besteht aus 66 AS und wird durch die Exons 3 und 4 kodiert (15;36;37). Die DBD erkennt spezifische Sequenzen der MR-Ziel-DNA, sogenannte Hormon-responsive Elemente (HRE) (22). Die DBD enthält zwei Zinkfinger-Strukturen, wobei die erstere die Bindung an die kleine Furche der DNA-Doppelhelix und die zweite die Rezeptordimerisation ermöglicht (36). Zwischen den zwei Zinkfinger-Strukturen liegt ein nukleäres Export-Signal (NES) (37). Zwischen den verschiedenen Steroidhormonrezeptoren ist diese Domäne hochkonserviert (35), so dass z.B. die DBD des MR und des GR zu 94% übereinstimmen (22).

Die Prolin-reiche **(3) Scharnierregion (hinge region oder D-Domäne)** (AS 671-732) (15) erlaubt eine Drehung der DBD hin zur LBD, wodurch eine korrekte Position des Rezeptors mit der Transkriptionsmaschinerie gewährleistet wird (38). In ihr existiert eine Liganden-unabhängige nukleäre Lokalisationssequenz (NLS1), die für die subzelluläre Rezeptorlokalisierung verantwortlich ist (15). Die hMR-Scharnierregion scheint bei der Rezeptor-Homodimerisation, wohl aber nicht bei der Heterodimerisation beteiligt zu sein (39).

Die **(4) Liganden-bindende Domäne (LBD oder E/F-Domäne)** des MR wird von den Exons 5-9 kodiert und stellt eine komplexe, multifunktionale Domäne aus 251 AS dar. Die AS sind in 12  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -Faltblatt organisiert, die drei antiparallele Schichten bilden (15;40-42). Sie beinhaltet die Liganden-abhängige Transaktivierungsdomäne AF-2 (*activation function domain*) (22), die nach selektiver Liganden-Bindung konformationell neu geordnet wird und so eine hydrophobe Tasche auf der Oberfläche der LBD bildet, die das LXXLL-Motiv enthält und die Bindung transkriptioneller Koaktivatoren erlaubt (22;41-43). Zudem enthält die LBD die nukleäre Translokationssequenz NLS2 (44). Die LBD scheint an einer Vielzahl der Aldosteron-/MR-vermittelten nicht-genotropen Signalwege beteiligt zu sein (45).

### **1.1.3 Funktionsweise des MR**

Im **Liganden-ungebundenen**, dh. inaktiven Zustand, befindet sich der MR vorwiegend im zytoplasmatischen Kompartiment (44). Dort interagiert er unter Bildung von Hetero-Oligomeren mit den Chaperonen hsp90, hsp70 (*heat shock protein*) und diversen Immunophilinen (15;46), welche eine Konformation aufrecht erhalten, die eine hochaffine Ligandenbindung an die LBD ermöglicht. Nach **Ligandenbindung** dissoziiert der MR von den o.g. Proteinen. Unter Kontrolle der nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) transloziert der aktivierte MR nach Bildung von Homodimeren in den Zellkern (34;44;47). Im Zellkern agiert der MR anschließend als Transkrip-

tionsfaktor, bindet innerhalb von Promotorregionen an Hormon-responsive Elemente (HRE) der DNA und moduliert somit die Expression Aldosteron-sensitiver Gene (20;38;48). Bisher konnte ein MR-spezifisches Promotor-Element (Mineralokortikoid-responsives Element, MRE) noch nicht identifiziert werden. Alle bislang beschriebenen HREs für den MR sind gleichzeitig Glukokortikoid-induzierbar (Glukokortikoid-responsive Elemente, GRE), so dass viele MR-induzierte Proteine auch durch den GR induziert werden. Das macht die Erklärung für MR-spezifische Effekte schwierig (5;48). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Promotor des humanen EGFR (*epidermal growth factor receptor*) MR-selektiv ist und ein Element enthalten könnte, das zumindest funktionell einem MRE entsprechen könnte (49). Neben der Homodimerisierung (MR/MR) ist auch die Bildung von **Heterodimeren** mit dem Glukokortikoid- oder Androgenrezeptor beschrieben (36;39) mit unterschiedlicher Auswirkung auf die Transkription (36;39;50;51).

#### **1.1.4 Posttranslationale Modifikationen des MR**

Die weitverbreitete Expression des MR in epithelialen und nicht-epithelialen Geweben erfordert eine feinstufige Modulation der Rezeptor-Aktivität für eine angemessene Wirkung. Hierfür dient die lokale Verfügbarkeit und Menge des MR, die Interaktion mit Kofaktoren, die Beeinflussung des MR-Transports in den Zellkern, der Cross-talk mit intrazellulären Signalkaskaden u.v.a. (52). Posttranslationale Modifikationen (PTM) stellen eine weitere Möglichkeit dar, die Funktionen des MR zu beeinflussen. In Bezug auf den humanen MR und dessen PTM ist noch nicht sehr viel bekannt.

Für eine **Phosphorylierung** stehen als potentielle Phosphorylierungsstellen im MR einige Tyrosin-, Serin- und Threonin-Reste zur Verfügung (52). Eine selektive und schnelle Phosphorylierung an Serin- und Threonin-Resten in renalen Zellen, die über eine PKC $\alpha$ -Aktivierung (Proteinkinase C  $\alpha$ ) vermittelt wird, scheint eine Schnittstelle zwischen genomischen und nicht-genomischen MR/Aldosteron-Wirkungen darzustellen (10;53). So deuten in vitro-Studien darauf hin, dass die Stimulation des MR durch Aldosteron eine Rezeptor-Phosphorylierung bewirkt, die über den MEK-ERK 1/2-Signalweg (*mitogen activated protein kinase kinase, extracellular regulated kinase*) vermittelt wird und die MR-Stabilität moduliert (52).

Im MR existieren zwei Lysin-Reste (in NTD und Scharnierregion), die für eine **Ubiquitynylierung** in Frage kämen (15). Über das Anfügen mehrerer Ubiquitin-Reste wird der MR dem proteasomalen Abbau zugeführt, wodurch dessen Expressionsniveau geregelt werden kann (52;54). Ferner ist eine Mono-Ubiquitynylierung beschrieben, die den MR zusammen mit anderen Faktoren, z.B. Tsg101 (Tumor Suppressor Gen 101), stabilisiert oder aber Aldosteron-induziert via ERK1/2 destabilisiert (52).

Die **Sumoylierung**, eine Modifikation durch sog. *small ubiquitin-related modifier* (SUMO), ist am MR an 5 Konsensus-Motiven möglich (22;32;55) und kann die Aktivität des MR als Transkriptionsfaktor abhängig vom Promotor-Kontext hemmen (32;52). Die Sumoylierung erfolgt hochselektiv und die Zielpositionen im Molekül werden anscheinend nicht durch andere posttranslationale Modifikationen verändert, was zur MR-Selektivität beiträgt (25).

Analog ist die **Neddylierung** (die Konjugierung des Ubiquitin-artigen Proteins Nedd8 (*neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein*) an Lysin-Reste) als hemmender Mechanismus für den Östrogen-, Androgen- und Progesteronrezeptor beschrieben und könnte ebenso repressiv auf den MR wirken (56).

Die **Acetylierung** des MR scheint dessen Aktivität zu hemmen. Gezeigt werden konnte dies anhand spontan hypertensiver Ratten, bei denen die Histon-Deacetylierung pharmakologisch mit Valproinsäure verhindert wurde. Die Ratten wiesen eine verringerte Aktivität des nun acetylierten MR auf, was wiederum einen positiven Effekt auf die kardiale Inflammation, Hypertrophie und Fibrose hatte (57).

Es konnte gezeigt werden, dass die **S-Nitrosylierung** bestimmter Cystein-Reste durch NO (*nitric oxide*, Stickstoffmonoxid) im GR die Fähigkeit zur Ligandenbindung vermindert (58). Der MR scheint ebenso für eine aktivitätshemmende S-Nitrosylierung empfänglich zu sein, wobei der direkte Nachweis einer entstandenen S-Nitrosocystein-Gruppe jedoch noch aussteht (59).

Eine **Carbonylierung** als PTM ist möglich, wenn Peroxynitrit und Kohlenstoffdioxid das instabile Zwischenprodukt Nitrosoperoxy-carbonat bilden, welches zügig in die Radikale Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2\cdot$ ) und Carbonat ( $\text{CO}_3\cdot^-$ ) zerfällt (60). Für den MR wurde die Carbonylierung unter oxidativen Stressbedingungen durch eine gestörte Aldosteron-Bindung als aktivitätshemmend beschrieben (61).

### **1.1.5 Mineralokortikoid-Selektivität**

Es wird angenommen, dass sich der MR und GR im Laufe der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül entwickelten (25;62). Dabei erwarb das Hormon Aldosteron nur MR-transaktivierende Fähigkeiten, während der MR selbst jedoch eine Affinität für Glukokortikoide behielt (63). Somit müssen Mechanismen existieren, die den MR selektiv wirken lassen, wenn er a) gegenüber Aldosteron und Kortikosteroiden eine vergleichbare Affinität besitzt, wenn b) Kortikosteroide in viel höherer Plasmakonzentration zirkulieren als Aldosteron und der MR allein deshalb mehr Cortisol als Aldosteron gebunden haben sollte und wenn c) in entsprechenden Zielgeweben sowohl der MR als auch der GR koexprimiert werden (15).

Auf **Prärezeptor-Ebene** des MR konnte gezeigt werden, dass eine Expression des MR auf die Zielgewebe begrenzt ist (64). Dort ist er zusammen mit spezifischen Koregulatoren lokalisiert,



wegen der GR ubiquitär zu finden ist (3). Die Cortisol-Konzentrationen im Plasma sind ca. 100-1000fach höher als die von Aldosteron, so dass trotz Berücksichtigung einer verstärkten Plasmaproteinbindung von Cortisol anzunehmen wäre, dass der MR durch das „überschüssige“ Glukokortikoid gebunden sein müsste (3). Eine Selektivität kann über die lokale Inaktivierung von Cortisol durch die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2 (11 $\beta$ -HSD2) erfolgen (65). Die 11 $\beta$ -HSD2 ist ein in MR-Zielgeweben lokalisiertes Enzym, das die Umwandlung von aktiven Glukokortikoiden in inaktive Metaboliten (Oxidationsreaktion) und die entsprechende Rückreaktion (Reduktionsreaktion) katalysiert (66;67). Für Cortisol/Cortison überwiegt die Inaktivierung (68).

Zusätzlich scheint die MR-Selektivität durch eine Änderung des Redoxstatus der Zelle reguliert zu werden: Als Kosubstrat wird bei aktiver 11 $\beta$ -HSD2 gleichzeitig NAD<sup>+</sup> zu NADH umgesetzt (69). Funder postulierte, dass der veränderte Redoxstatus die Konformation des Liganden gebundenen MR beeinflusst und somit dessen Kofaktor-Bindungsprofil mitbestimmt (70). Die Bindung von Glukokortikoiden führt zur Inhibierung, indem vermehrt Korepressoren rekrutiert werden (70). Das Vorhandensein der 11 $\beta$ -HSD2 ist eine Erklärung für die MR-Selektivität von Aldosteron in klassischen Zielgeweben.

Auf **Rezeptor-Ebene** kann der MR Aldosteron bzw. Glukokortikoide als Liganden zwar gleichermaßen binden (64), wird jedoch nach Aldosteronbindung stärker transaktiviert (2;64). Dies wird durch eine Liganden-abhängige Domänen-Interaktion zwischen der N-terminalen und der Liganden-bindenden Domäne des MR erreicht (N/C-Interaktion), wodurch die spezifische Rekrutierung von Koregulatoren erfolgt (71) und so eine stabilere Konformation des MR nach Aldosteron- im Vergleich zur Cortisolbindung erzielt wird (41;72;73). Die N-/C-Interaktion wird durch die MR-Antagonisten Spironolakton und Eplerenon verhindert (25).

Auf der **Postrezeptor-Ebene** spielen Koregulatoren, also Koaktivatoren und –repressoren, eine Rolle. Es wird angenommen, dass der MR-Aldosteron-Komplex die Interaktion mit Koregulatoren nach Bindung an das Hormon-responsive Element beeinflusst und so seine spezifische Wirkung entfalten kann (15;64), obwohl sich der MR ein HRE mit dem GR teilt (48). Diskutiert werden desweiteren MR-spezifische Bindungsstellen an der DNA. Am Beispiel des EGFR, der Aldosteron- und MR-abhängig vermehrt exprimiert wird, wurden Bindungsstellen im EGFR-Promotor identifiziert, die spezifisch für den MR, aber nicht für den GR sind und demnach zumindest funktionell als MRE (MRE1) betitelt wurden (49).

Es sind zahlreiche Koaktivatoren und Korepressoren beschrieben, die die transkriptionelle MR-Aktivität beeinflussen (15;22;74). Zu den selektiven MR-Koaktivatoren zählen z.B. der humane Polymerase II-Elongationsfaktor ELL (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia*) (75), die RNA-Helicase A (71), das cerebral lokalisierte FAF-1 (*Fas-associated factor 1*) (76) sowie Ubc 9

(*ubiquitin-conjugating enzyme 9*) (77). Als selektive MR-Korepressoren seien NF- $\kappa$ B (*nuclear transcription factor*) (78) und PIAS1 (*protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription*) (32;55) beispielhaft genannt.

## **1.2 Aldosteron**

Aldosteron zählt zusammen mit Deoxycorticosteron zu den humanen Mineralokortikoiden. Es ist der Hauptligand des MR und ein Steroidhormon, das aus dem Vorläufermolekül Cholesterin v.a. in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet wird (**adrenale Aldosteron-Synthese**) (3). Der Abbau der Steroidhormone findet vor allem in der Leber statt (79;80).

Aldosteron ist Teil einer Hormon-Kaskade, dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (**RAAS**). Die Aldosteron-Biosynthese und -Sekretion unterliegt der Regulation durch Angiotensin II, ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und der Serum-  $K^+$ -Konzentration, wird bei vermindertem Blutvolumen und Blutdruck stimuliert und zielt auf eine  $Na^+$ -Reabsorption und  $K^+$ -Sekretion im distalen Nephron der Niere und im Colon ab (3;5). Dort diffundiert Aldosteron in die Zellen und bindet an seinen Rezeptor, den MR.

Abseits der klassischen Zielgewebe gibt es Hinweise auf eine lokale Aldosteron-Synthese (**extraadrenale Aldosteron-Synthese**): Im kardiovaskulären System bspw. in humanen Endothelzellen und VSMC (*vascular smooth muscle cells*) (7;79;81). Da der Nachweis der zur Synthese benötigten Enzyme bislang häufig nur auf mRNA-Ebene gelang, wird eine funktionstüchtige lokale Aldosteron-Synthese im kardiovaskulären System jedoch noch kontrovers diskutiert (7). Zum Teil wird angenommen, dass die Aldosteron-Synthese in Gefäßen und im Herzen mit der Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen zusammenhängt, da eine Zunahme der lokalen Aldosteron-Konzentration bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder Hypertonie festzustellen war (82;83). Im Vergleich dazu wird eine lokale Aldosteron-Synthese im Gehirn als gesichert betrachtet (79;81;84) und wahrscheinlich wie in der Nebenniere über die Salz-Aufnahme reguliert (79;85). Die lokale Aldosteron-Synthese im Gehirn scheint eine wichtige Rolle bei der parakrinen Regulation des systemischen Blutdrucks zu spielen (86).

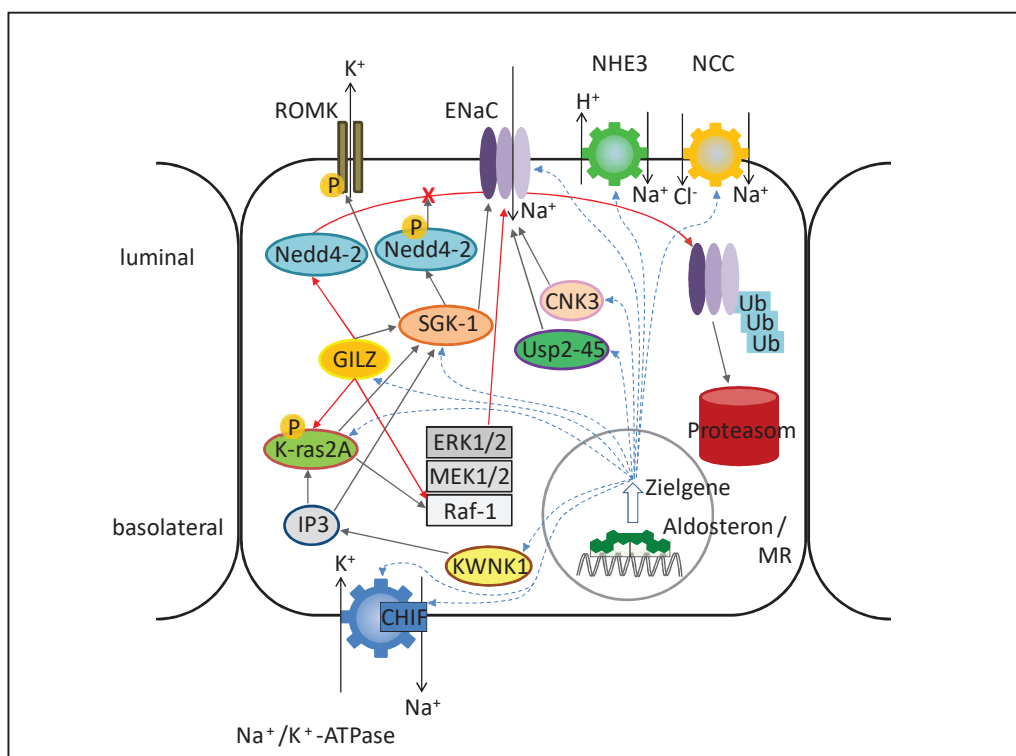
## **1.3 Signalgebung von Aldosteron/MR**

### **1.3.1 Klassische, epitheliale, genomische Aldosteron/MR-Wirkungen**

Als klassische Steroidhormon-Wirkung bindet Aldosteron an den MR (2). Der aktivierte MR wirkt als Transkriptionsfaktor und moduliert die Expression zahlreicher Aldosteron-sensitiver Proteine (22;87) (Abb. 2). Zu den klassischen Zielgeweben zählen das distale Nephron der Niere, Colon, Schweiß- und Speicheldrüsen (22;48;88-90).

Innerhalb dieser Gewebe ist der MR in den polarisierten Epithel-Zellen lokalisiert, die für den gerichteten Natrium-Transport aus dem Lumen ins Interstitium verantwortlich sind, bspw. in den Hauptzellen der Niere (91). Die zelluläre Antwort führt zu  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Reabsorption, begleitet von  $\text{K}^+$ - und  $\text{H}^+$ -Sekretion mit anschließender  $\text{H}_2\text{O}$ -Retention. Dies bewirkt systemische Veränderungen wie Salz- und Volumenretention, die zu Blutdruckerhöhung, Hypokaliämie und Alkalose führen (15). Die hauptsächlichen Komponenten hierfür sind ein apikaler Natrium-Kanal (ENaC) (92) und eine Energie-verbrauchende  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der basolateralen Membran (87;93). Dabei stellt der Natrium-Strom über die apikale Membran die Fluss-limitierende Komponente dar (3).

Die Aldosteron-Wirkung beeinflusst zunächst den transzellulären Elektrolyttransport (frühe Phase, 1-6 Stunden), indem bereits vorhandene Signalmoleküle wie Ionenkanäle u.a. post-translational moduliert werden, bevor die Expression von Kanälen und Transportproteinen verändert wird (späte Phase, > 6 Stunden) (3;94).



**Abb. 2:** Zielgene der klassischen, genomischen Aldosteron/MR-Wirkung und deren Interaktionen.

(CHIF: *channel-inducing factor*,  $\text{Cl}^-$ : Chlorid-Ion, CNK3: *connector enhancer of kinase suppressor of Ras-3*, DAG: Diacylglycerol, ENaC: epithelialer Natrium-Kanal,  $\text{H}^+$ : Proton,  $\text{IP}_3$ : Inositol-Triphosphat, ERK1/2: *extracellular regulated kinase 1/2*, GILZ: Glukokortikoid-induziertes Leuzin Zipper Protein,  $\text{K}^+$ : Kalium-Ion, K-ras2A: *Kirsten ras 2A*, KWNK1: *kidney specific with no lysine kinase 1*, MEK1/2: *mitogen activated protein kinase kinase 1/2*, MR: Mineralokortikoidrezeptor,  $\text{Na}^+$ : Natrium-Ion, NCC:  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter, Nedd4-2: *neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4-2*, NHE3:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher Isoform 3, P: Phosphat, PKC: Proteinkinase C, Raf-1: *rapidly accelerated fibrosarcoma-1*, ROMK: *rat outer medullary K<sup>+</sup>-channel*, SGK-1: Serum- und Glukokortikoid-regulierte Protein-Kinase 1, Ub: Ubiquitin, Usp2-45: *ubiquitin-specific protease 2-45*)

Eines der wichtigsten Aldosteron-induzierten Gene führt zur Expression von Untereinheiten des (Amilorid-sensitiven) epithelialen Natrium-Kanals (**ENaC** = *epithelial Na<sup>+</sup>-channel*), welcher sich in der apikalen Zellmembran Na<sup>+</sup>-reabsorbierender Epithelien befindet und einen passiven, unidirektionalen Na<sup>+</sup>-Einstrom in die Zelle zulässt (87;92;95). ENaC-Mutationen führen zum Liddle-Syndrom, einer hereditären Form der arteriellen Hypertonie mit ENaC-Überaktivität (96-101). Inaktivierende Mutationen führen zur autosomal-rezessiv vererbten Form der Aldosteron-Resistenz (Pseudohypoaldosteronismus) (98;99). Zur Na<sup>+</sup>-Reabsorption unter Aldosteron-Einfluss tragen auch der luminal lokalisierte Thiazid-sensitive Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Kotransporter (NCC) und der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher (NHE) bei (3).

Der für die ENaC-Aktivität notwendige Ionengradient wird von der basolateral lokalisierten **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase** aufrecht erhalten, welche den Na<sup>+</sup>-Austritt aus der Zelle Energie-abhängig fördert (3;102). Aldosteron stimuliert die Synthese des kleinen transmembranären Modulationsproteins **CHIF** (*channel inducing factor*), das die  $\gamma$ -Untereinheit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase darstellt und die Affinität der Pumpe zu Na<sup>+</sup>-Ionen erhöht (87;103).

Die ENaC-Aktivität wird durch indirekte genomische MR-Wirkungen beeinflusst. Z.B. wird die **SGK-1** (= Serum- und Glukokortikoid-regulierte Protein-Kinase 1) durch Aldosteron-Einfluss vermehrt exprimiert (104). Die SGK-1 phosphoryliert die Ubiquitin-Protein-Ligase **Nedd4-2** (*neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4*), wodurch die proteasomale ENaC-Degradation gehemmt wird (102;104;105). Aldosteron induziert desweiteren die Deubiquitynylierung des ENaC und damit dessen Aktivitätssteigerung durch die Ubiquitin-spezifische Protease **Usp2-45** (106). Zusätzlich scheint die SGK-1 direkt in Interaktion mit dem ENaC zu treten, indem es den C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit phosphoryliert und so die Kanalaktivität direkt steigert (107). Die **K-WNK1** (*kidney specific with no lysine kinase*) (22) führt zu einer Phosphorylierungskaskade, die über die **Inositol-Triphosphat-Kinase (IP3-Kinase)** phosphoryliert (21;106;108) und über **K-ras2A** (*Kirsten ras 2A*), einem zeitlich betrachtet eines der ersten Aldosteron-induzierten Gene (3;109), zur Aktivierung der SGK-1 (106) und damit zur Aktivitätssteigerung des ENaC (110) beiträgt.

Ein weiteres Aldosteron-induziertes Gen ist das Glukokortikoid-induzierte Leuzin Zipper Protein (**GILZ**). GILZ erhöht die ENaC-Aktivität, indem es über eine Hemmung des Raf-1, MEK1/2, ERK1/2-Signalweges (*rapidly accelerated fibrosarcoma, mitogen activated protein kinase kinase, extracellular regulated kinase*) die Interaktion zu Nedd4-2 moduliert (104) und indem es die K-ras-Wirkung neutralisiert (106). Zusätzlich hemmt es den Abbau der SGK-1, womit dessen Aktivität wiederum gesteigert wird (104). Der Raf-1, MEK1/2, ERK1/2-Signalweg wird auch durch das **CNK3** (*connector enhancer of kinase suppressor of Ras-3*) Aldosteron-induziert gehemmt (104) und steigert die ENaC-Aktivität.

Ein indirekt durch Aldosteron-Einfluss betroffenes Gen ist **ROMK** (*rat outer medullary K<sup>+</sup>-channel*), ein in das Lumen gerichteter renaler Kalium-Kanal, der zur kaliuretischen Wirkung von Aldosteron beiträgt (111). Seine Kanaldichte wird über eine Phosphorylierung durch die SGK-1 erhöht (21).

### **1.3.2 Nicht-genotrope Aldosteron/MR-Wirkungen**

Schnelle, nicht-genotrope Aldosteron/MR-Wirkungen (21) finden ohne RNA- oder Protein-Synthese statt (53). Sie treten im Vergleich zu klassischen genomischen Wirkungen innerhalb kürzester Zeit auf und klingen in der Regel innerhalb weniger Minuten wieder ab (21). Eine Wirkpersistenz über einen längeren Zeitraum ist jedoch möglich (112). Die nicht-genotropen Aldosteron-Wirkungen wurden sowohl in klassischen (z.B. Niere und Intestinum) (5;10) als auch in nicht-klassischen MR-Zielgeweben (z.B. kardiovaskuläres System mit VSMC und Endothelzellen) (5;9;53) beobachtet.

Es wird kontrovers diskutiert, ob Aldosteron über den klassischen MR oder einen bisher nicht identifizierten Rezeptor agiert (113) (Abb. 3). Für Östrogen und Progesteron konnten membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren charakterisiert werden (114-116), die vermuten lassen, dass es auch für Aldosteron einen alternativen, membranständigen Rezeptor geben könnte (3;117). Ferner trägt der MR über die Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden zu nicht-genotropen Effekten bei (45). Bspw. stimuliert der MR die EGFR-vermittelte Phosphorylierung der ERK1/2, Rho-Kinase und p38-Kinase, welche wiederum zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP1 (Aktivator-Protein 1) und NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) führen (48;118). Als Vermittler zwischen MR und EGFR konnte die zytosolische Kinase cSRC identifiziert werden (9;14). Die EGFR-Transaktivierung trägt wahrscheinlich zur pathophysiologischen MR-Wirkung bei und scheint über eine erhöhte Kollagen-Produktion eine zentrale Rolle bei kardiovaskulärer Hypertrophie und Fibrose zu spielen (9;119;120). Damit kann der MR auch indirekt die Transkription beeinflussen, so dass sich der Begriff „nicht-genotrop“ anstatt „nicht-genomisch“ etabliert hat.

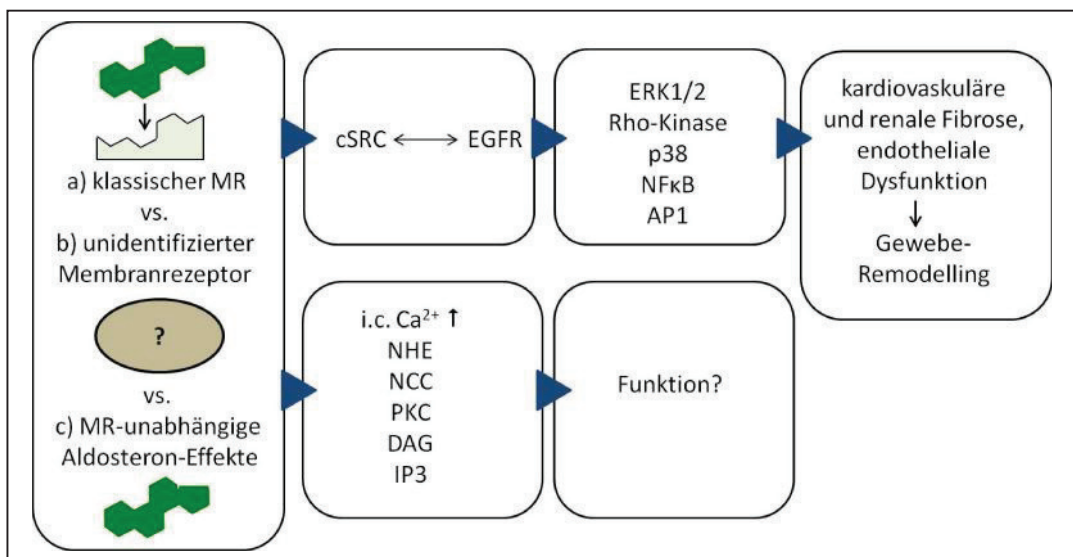
Möglich ist, dass die MR-abhängige, nicht-genotrope Signalgebung über die EF-Domäne des MR vermittelt wird, wie Versuche mit MR-Deletionskonstrukten von Grossmann et al. gezeigt haben (45).

Weiterhin gibt es Hinweise auf eine MR-unabhängige Aldosteron-Wirkung, da einige Aldosteron-vermittelte Effekte durch traditionelle MR-Inhibitoren (z.B. Spironolakton) nicht gehemmt (121) oder durch Glukokortikoide in Abwesenheit einer 11β-HSD2 nicht imitiert (3) werden können. Auch gibt es Experimente mit Hautzellen von MR-knockout-Mäusen, bei denen durch Aldosteron-Gabe ein schneller (< 3 Minuten) intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und eine

cAMP-Erhöhung (zyklisches Adenosinmonophosphat) zu beobachten waren trotz Abwesenheit des MR (12).

Typische Aldosteron-induzierte, nicht-genotrope Signal-Ereignisse beinhalten die Aktivierung von Pumpen und Transportern, z.B. Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes über den NHE (11;122), Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (123;124), Aktivierung des  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporters (11;112;124;125), Stimulation der PKC (112;124), Diacylglycerol (DAG) (13), Inositol-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) (125), Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 oder cSrc-Kinase (9;11;48;126) sowie die Transaktivierung des EGFR (5;45). Über die Beeinflussung diverser zellulärer Signalkaskaden werden je nach Zellart recht unterschiedliche, z.T. sogar gegenteilige Effekte beobachtet. Bspw. wurde in VSMC durch Aldosteron-Einwirkung die Stimulation der PKC beobachtet (3;13), wohingegen in Myozyten nach Aldosteron-Einfluss eine schnelle PKC-Hemmung festgestellt wurde (127).

Zahlreiche Interaktionen zwischen den klassischen und nicht-genotropen Aktivitäten des MR werden angenommen (9;10;128). Es konnten bisher viele pathophysiologische Auswirkungen der nicht-genotropen Aldosteron-Aktivität beschrieben werden, so z. B. eine vermehrte Kollagen III-Expression (118;129;130), was zum kardiovaskulären und renalen Remodelling beiträgt (45). Allerdings bleibt der ursprüngliche physiologische Kontext der nicht-genotropen Aldosteron-MR-Aktivität weiterhin noch relativ schlecht verstanden (131;132).



**Abb. 3:** Schematische Übersicht nicht-genotroper Aldosteron/MR-Wirkungen

(AP1: Aktivator-Protein 1, cSRC: *cellular steroid receptor coactivator*, DAG: Diacylglycerol, EGFR: *epidermal growth factor receptor*, ERK1/2: *extracellular regulated kinase 1/2*, i.c.  $Ca^{2+}$ : intrazelluläre Calcium-Konzentration, IP<sub>3</sub>: Inositol-Triphosphat, MR: Mineralokortikoidrezeptor, NCC:  $Na^+/K^+/2Cl^-$ -Kotransporter, NFκB: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, NHE:  $Na^+/H^+$ -Austauscher, p38: mitogenaktivierte Proteinkinase 38, PKC: Proteinkinase C)

### **1.3.3 Nicht-epitheliale, nicht-klassische Mechanismen der Aldosteron/MR-Wirkung**

Eine MR-Expression ist fast ubiquitär nachzuweisen, wobei die Bedeutung dieses weitgestreuten Expressionsmusters noch weitestgehend schlecht verstanden wird. Besondere Bedeutung erlangen das kardiovaskuläre System und das ZNS (zentrales Nervensystem) (21;133;134).

Im Herzen und Gefäßsystem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Aldosteron zusammen mit einer salzreichen Ernährung zu Hypertension, kardialer Hypertrophie sowie Fibrose führt (134). Allein durch eine Aldosteron-vermittelte MR-Wirkung können diese Folgen jedoch nicht ausreichend erklärt werden. Bspw. wird in Kardiomyozyten zwar der MR, jedoch nicht die 11 $\beta$ -HSD2 exprimiert. Demzufolge ist anzunehmen, dass der MR ständig durch **endogene Glukokortikoide** besetzt wäre. Durch Glukokortikoid-Bindung werden in Kardiomyozyten jedoch MR-antagonistische Wirkungen hervorgerufen (135). In glatten Gefäßmuskelzellen dagegen, die sowohl den MR als auch die 11 $\beta$ -HSD2 exprimieren, können Glukokortikoide nach selektiver 11 $\beta$ -HSD2-Hemmung (mit Carbenoxolon) MR-agonistisch wirken (121). Oxidativer Stress und **inflammatorische Mechanismen** in der Gefäßwand gelten als Schlüsselmediatoren der pathogenen MR-Aktivierung. Das dadurch auf zellulärer Ebene veränderte Redox-Potenzial gilt als ein essentieller Bestandteil in der Initiation und Progression kardioresnaler Fibrose (21;70;130). Durch die perivaskuläre Infiltration proinflammatorischer Zellen sowie die Expression proinflammatorischer Faktoren (z.B. ICAM1 (*intercellular adhesion molecule 1*), MCP-1 (Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1), Zytokine wie Osteopontin und Cyclooxygenase 2) wird dieser Zustand aufrecht erhalten (130;136).

Ein anderer Faktor, der modulierend auf die MR-Aktivität im kardiovaskulären System wirkt, betrifft die **Rezeptor-Verfügbarkeit vasoaktiver Substanzen**: Zum Bsp. führte im Ratten-Herzen eine Aldosteron-Behandlung zur gesteigerten Verfügbarkeit und damit vermehrten Aktivität des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptors (AT1-Rezeptor) (5;21;137). Die medikamentöse Aldosteron- und AT1-Blockade trägt zur Prävention kardiovaskulären Remodellings bei.

Die pathophysiologischen Aldosteron- bzw. MR-Wirkungen im kardiovaskulären System scheinen nicht aufgrund einer hämodynamischen Beeinflussung zu entstehen, sondern durch eine direkte kardiovaskuläre Beeinflussung, da sie unabhängig vom systolischen Blutdruck und kardialer Hypertrophie auftreten. Eine Hypertrophie des Herzens ist jedoch oftmals die Folge (21;134). Dabei werden zahlreiche und komplexe **zelluläre Signalkaskaden** stimuliert, die bspw. die Aktivierung des TGF- $\beta$ 1 (dem Fibrose-fördernden *transforming growth factor*  $\beta$ 1), *tissue growth factor* und PAI (Plasminogen Aktivator-Inhibitor), den p38 MAPK-Signalweg und vielfältigste Interaktionen beinhalten (21;138). Einen Beitrag zur myokardialen und renotubulo-interstitiellen Fibrose (22) liefert der durch Aldosteron stimulierte MEK/ERK-

Signalweg über die MR-vermittelte ERK1/2-Kaskade, so dass es zu einer vermehrten Bildung von Extrazellulärmatrix kommt (49;118;129;134).

Weiterhin beeinflusst Aldosteron die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers-Isoform 1 (NHE1) und kann somit über den **intrazellulären pH** eine gefäßschädigende Wirkung z.B. in Form von vasculärer Inflammation fördern (121). Diese wiederum fördert kardiale Veränderungen wie Hypertrophie, Arrhythmie und beeinträchtigt die Kontraktilität (21). Einem durch MR-Aktivierung erhöhten Strom am L-Typ-Calcium-Kanal in ventrikulären Myozyten wird ebenso eine proarrhythmogene Wirkung zugeschrieben (139).

Die pathophysiologischen Folgen einer chronischen, eventuell exzessiven MR-Aktivierung gehen nicht zwangsläufig mit einem erhöhten Plasma-Aldosteron-Spiegel einher. Auch scheinen die pathophysiologischen Veränderungen unabhängig vom Blutdruck zu sein (133). Mehrere klinische Studien (**RALES, EPHEBUS, 4E-Studie**) konnten den Nutzen einer MR-Blockade mit Spironolacton oder Eplerenon in nicht-blutdrucksenkenden Dosierungen in Hinblick auf die Morbidität und Mortalität bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion aufzeigen (7;140;141).

Im **ZNS** sind MR-Effekte an der Wasser- und Natrium-Homöostase mit Vermittlung von Durst und Salzappetit, Osmorezeption, Integration von Informationen aus Barorezeptoren und dem autonomen Nervensystem im Rahmen der Blutdruckregulation sowie Mitbeteiligung an der Sekretion von Vasopressin und dem natriuretischen Faktor beteiligt (142;143). Im Gegensatz zum weitgestreuten Verteilungsmuster des GR ist die MR-Expression im Gehirn topographisch sehr viel begrenzter (z.B. Hippocampus, laterales Septum, Amygdala) (133;144). Durch intracerebroventrikuläre Gabe von Aldosteron- oder MR-Antagonisten wurde gezeigt, dass die zentralen MR-Effekte höchstwahrscheinlich über die Modulation der sympathikotonen Aktivität wirken (5).

#### **1.4 Stickstoffmonoxid (NO) und Radikalstress**

Bevor Ferid Murad 1977 die Verbindung Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) näher charakterisierte, war diese seit Mitte des 19. Jahrhunderts nur in Form von Nitroglycerin in dem von Alfred Nobel entwickelten Dynamit bekannt (145). Insbesondere die Fabrikarbeiter der Dynamitindustrie bekamen die (Gewöhnung an die) vasorelaxierende Wirkung des NO nach längerer Abwesenheit vom Arbeitsplatz in Form von starken Kopfschmerzen und auch Herzattacken zu spüren (145). Seitdem besitzt Nitroglycerin bzw. Amylnitrit einen hohen Stellenwert als Antianginosum. 1987 beschrieben Robert Furchgott und John Zawadzki den *endothelial derived relaxing factor* (EDRF) als einen aus den intakten Gefäßendothelzellen freigesetzten Botenstoff mit vasodilatatorischer Wirkung (145). Louis Ignarro und Salvador Moncada identifi-



zierten schließlich 1987 den EDRF als Stickstoffmonoxid (145). 1992 wurde NO durch das Science Magazine zum „*Molecule of the Year*“ gekürt und Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad wurden 1998 für die Arbeiten über die Signaleigenschaften von NO mit dem Nobel-Preis ausgezeichnet (146).

#### **1.4.1 NO-Bildung**

Stickstoffmonoxid wird durch das Hämgruppen-haltige Metalloenzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS, *nitric oxide synthase*) gebildet (147). Es sind drei Isoformen mit weitgestreutem Expressionsmuster bekannt (147). Die NOS1 (oder nNOS; n...neuronal) wurde zunächst in neuronalem Gewebe identifiziert (147). Die NOS2-Expression, oder iNOS (i...*inducible*), wird durch pro-inflammatorische Zytokine oder mikrobielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide bspw. in Makrophagen induziert. Die NOS3, auch eNOS (e...endothelial) genannt, ist typischerweise an der Plasmamembran von Endothelzellen zu finden und wird durch chronischen Scherstress in den durchströmten Blutgefäßen induziert (60;148). Die nNOS und eNOS besitzen konstitutive Aktivität, während die iNOS nahezu keine basale Aktivität aufweist (60;147;148). Die NOS-Aktivität ist abhängig von den Kofaktoren NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat), FMN (Flavin-Mononukleotid), FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid), Calmodulin und BH4 (Tetrahydrobiopterin) (147;148). Die NOS nutzen molekularen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) als Kosubstrat und katalysieren die Oxidation von L-Arginin über N-Hydroxyarginin zu Citrullin plus NO (148). NOS-unabhängig besteht auch die Möglichkeit, dass NO als Nitrit-Derivat durch reduzierende Systeme, wie z.B. die Atmungskette oder die Xanthin-Oxidase unter hypoxischen/ anoxischen Bedingungen freigesetzt wird (146;149;150).

#### **1.4.2 Diffusions- und Signaleigenschaften von NO**

Als Zellsignalmolekül nimmt NO an verschiedenen physiologischen Prozessen wie Neurotransmission, Regulation der vaskulären Dynamik und Immunregulation teil (148;151). NO besitzt ein ungepaartes Elektron, weshalb es mit freien Radikalen reagieren kann (60). Aufgrund seiner Lipophilie kann NO leicht durch Zellmembranen diffundieren. Durch die kurze Lebensdauer von ~ 1 Sekunde und die Kollisionen mit anderen Molekülen erstreckt sich der Bewegungsradius eines einzelnen NO-Moleküls über nur wenige Zellen, weshalb dem im Gewebe gebildeten NO eine parakrine Rolle zugeschrieben wird (60). Im Blut kann NO an das zweiwertige Eisen im Hämoglobin (Hb) binden (152). Desoxygeniertes Hb bindet NO mit einer 10.000-fach höheren Affinität als molekularen Sauerstoff, weshalb Erythrozyten im Gefäßkompartiment ein Hauptaufnehmer von NO in vivo sind (60;153). Es entstehen S-Nitrosohämoglobin und Methämoglobin (60;152;153), die durch den Blutfluss transportiert werden und NO an produktionsfer-

neren Stellen wieder freisetzen können (151;153). Dadurch erlangt NO eine hormonähnliche Funktion.

Seine Wirkung entfaltet NO klassischerweise durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (*soluble guanylyl cyclase*, sGC) in glatten Gefäßmuskelzellen. Die sGC bildet als second messenger vermehrt zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) (154;155). cGMP aktiviert im Zielgewebe cGMP-abhängige Kinasen, z.B. die Proteinkinase G (PKG), die die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration modulieren und so diverse Aktivitäten im Zielgewebe beeinflussen (bspw. Vasodilatation, Thrombozytenaggregation, interneuronale Kommunikation und gastrointestinale Motilität) (60;146;154).

### **1.4.3 Funktionsvielfalt von NO**

Die Vielfalt biologischer NO-Wirkungen beruht auf den Interaktionen zwischen NO bzw. NO-Derivaten und einer breiten Spanne an Biomolekülen (insbesondere die Reaktion mit deren Metallzentren), Thiolen und reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) (146;149;156).

Eine klassische Funktion besitzt das im Gefäßendothel durch die eNOS gebildete NO mit der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und vasodilatierendem Effekt zur Erhöhung des lokalen Blutflusses. Dieser Effekt wird wie oben beschrieben cGMP-vermittelt und über eine Senkung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration bewirkt (146;155). cGMP-unabhängig kann NO zur Vasodilatation über die S-Nitrosylierung bestimmter Cystein-Reste und Regulation der Aktivität  $Ca^{2+}$ -sensitiver  $K^+$ -Kanäle führen (146;157). Im Herzen wird NO vom Koronarendothel, Kardiomyozyten und Nervenendigungen freigesetzt und führt zu einer abnehmenden Kontraktionsfähigkeit, einem verlängerten diastolischen Intervall und zu einer reduzierten Herzfrequenz, wodurch die ventrikuläre Perfusion und die Ventrikelfüllung verbessert werden (146). Ebenfalls cGMP-PKG-vermittelt beeinflusst NO die Hämostase durch Inhibierung der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation (146;148). Weiterhin beeinflusst NO den Stoffwechsel, indem es die Glukose-Aufnahme in Skelettmuskelzellen, Adipozyten und Gefäßzellen, aber auch Fettsäureoxidation und Lipolyse fördert und die de novo-Fettsäure-Synthese in der Leber hemmt (60;146). Eine wichtige Rolle spielt NO im zentralen und peripheren Nervensystem. Zentral wird NO von der nNOS in Neuronen und von der eNOS vaskulärer Endothelzellen freigesetzt und beeinflusst zahlreiche Prozesse, wie Lernen, Essen, Wachen und Schlafen, Neurosekretion und Verhalten (146;148). Im peripheren Nervensystem agiert NO als Neurotransmitter nitrenger Nerven, die elektrische Signale aus dem ZNS via parasymphischer präganglionärer Nervenfasern und Ganglien erhalten und zur Regulation des Tonus glatter Muskelzellen von Blutgefäßen, Gastrointestinaltrakt, Corpus cavernosum des Penis, Urethra und Prostata beitragen (146;148). Physiologisch wird NO in größeren Mengen von Immunzellen wie Makropha-

gen, Nukleophilen, Monozyten und von-Kupffer-Zellen gebildet und dient der unspezifischen Immunabwehr gegen Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze. NO und NO-Derivate (v.a. Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>)) führen zusammen mit ROS u.a. zu DNA-Schädigung, Proteinsynthesehemmung, beeinträchtigter Protein- und Enzymfunktion und üben so einen antimikrobiellen Effekt aus (146;150). Im Rahmen einer Immunantwort besitzt NO bivalente Eigenschaften. Zum einen gilt es als anti-inflammatorisch, da das durch die nNOS und eNOS konstitutiv gebildete NO die Neutrophilen-Antwort abschwächt und auch das Endothel in Bezug auf die Leukozyten-Adhäsion in einem „ruhigen“ Zustand hält. Im Kontrast dazu steht die durch Zytokin-Ausschüttung vermehrte NO-Bildung durch die iNOS, wobei das dadurch ebenfalls vermehrt anfallende Peroxynitrit als starkes Oxidanz die Inflammation aufrecht erhalten kann (146;158;159). Letztlich ist NO ein vielfältig wirkender zellulärer Messenger, der eine Reihe biologischer Funktionen durch sein nahezu omnipräsentes Auftreten im menschlichen Organismus beeinflusst.

#### **1.4.4 Zytotoxische Bedeutung von NO: Charakterisierung von RNS und ROS**

Reaktive freie Radikale sind an physiologischen Prozessen wie Zellsignalgebung, Inflammation und Immunantwort beteiligt, tragen aber auch zur Pathogenese humaner Erkrankungen wie kardiovaskuläre und neurologische Erkrankungen sowie Krebs und den physiologischen Alterungsprozess bei (60;151).

Als „reaktive Stickstoff-Spezies“ (*reactive nitrogen species*, RNS) bzw. „reaktive Sauerstoff-Spezies“ (*reactive oxygen species*, ROS) werden inhomogene Gruppen Stickstoff- bzw. Sauerstoff-haltiger Verbindungen bezeichnet. Als Grundlage für RNS dient NO, das als freies Radikal zu Nitrosonium-Kation (NO<sup>+</sup>), Nitroxyl-Anion (NO<sup>-</sup>), Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) sowie Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) überführt werden kann. Zudem kann es mit Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) zu Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) reagieren (149;150;154). Diese teils hochreaktiven Substanzen verursachen eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit zugunsten einer gesteigerten, NO-bedingten (Zyto-) Toxizität. Dieses Ungleichgewicht wird als „nitrosativer Stress“ bezeichnet, wohingegen als „oxidativer Stress“ ein Ungleichgewicht zwischen der zellulären Bildung oxidierender Moleküle und der Verfügbarkeit antioxidativer Substanzen bezeichnet wird (148;150;151;154). Hierbei sind ROS-Moleküle beteiligt: zum einen freie Radikale, wie Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Hydroxyl-Radikal (HO<sup>•</sup>), Lipid-Radikale (ROO<sup>•</sup>) und auch Stickstoffmonoxid (NO) selbst. Andere ROS, wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) und hypochlorige Säure (HOCl), sind zwar keine freien Radikale, weisen aber ebenso oxidierende Wirkung auf (151;154). Die Bildung eines freien Radikals kann über sequentielle Kettenreaktionen ähnlich wie beim Schneeball-Prinzip zur weiteren Radikalbildung führen.

#### **1.4.5 Physiologische Entstehung und Bedeutung von RNS/ROS**

Die Entstehung von ROS und RNS ist keineswegs ein rein pathologischer Prozess. Viele Mechanismen führen unter physiologischen Bedingungen in der Zelle zur Bildung freier Radikale (151) (Abb. 4).

Im Rahmen des Elektronentransports entsteht bei der mitochondrialen Atmung durch das Vorhandensein molekularen Sauerstoffs eine nicht unerhebliche Menge an reaktiven Spezies, insbesondere ROS in der Zelle, wobei der Großteil innerhalb der intakten Mitochondrien verbleibt und durch intramitochondriale, antioxidative Reaktionen neutralisiert werden kann (160). Innerhalb von Gefäßwänden sind Endothelzellen die Hauptquellen der ROS, insbesondere durch die NADH/NADPH-Oxidasen, welche als membranassoziierte Enzyme die Reduktion von  $O_2$  unter Nutzung von NADH/NADPH als Elektronendonator katalysieren (151). Als hauptsächliche endovaskuläre und kardiale ROS-Quellen wird die Aktivität der NADH/NADPH-Oxidasen durch einige Zytokine, Hormone, sowie lokale metabolische und hämodynamische Veränderungen moduliert (150;151).

Eine weitere RNS/ROS-Quelle ist das Xanthin-Oxido-Reduktase-System welches im Purin-Stoffwechsel die Hydroxylierung von Hypoxanthin zu Xanthin und anschließend zu Harnsäure unter Bildung von Superoxid-Anion und Wasserstoffperoxid katalysiert (60;149;150).

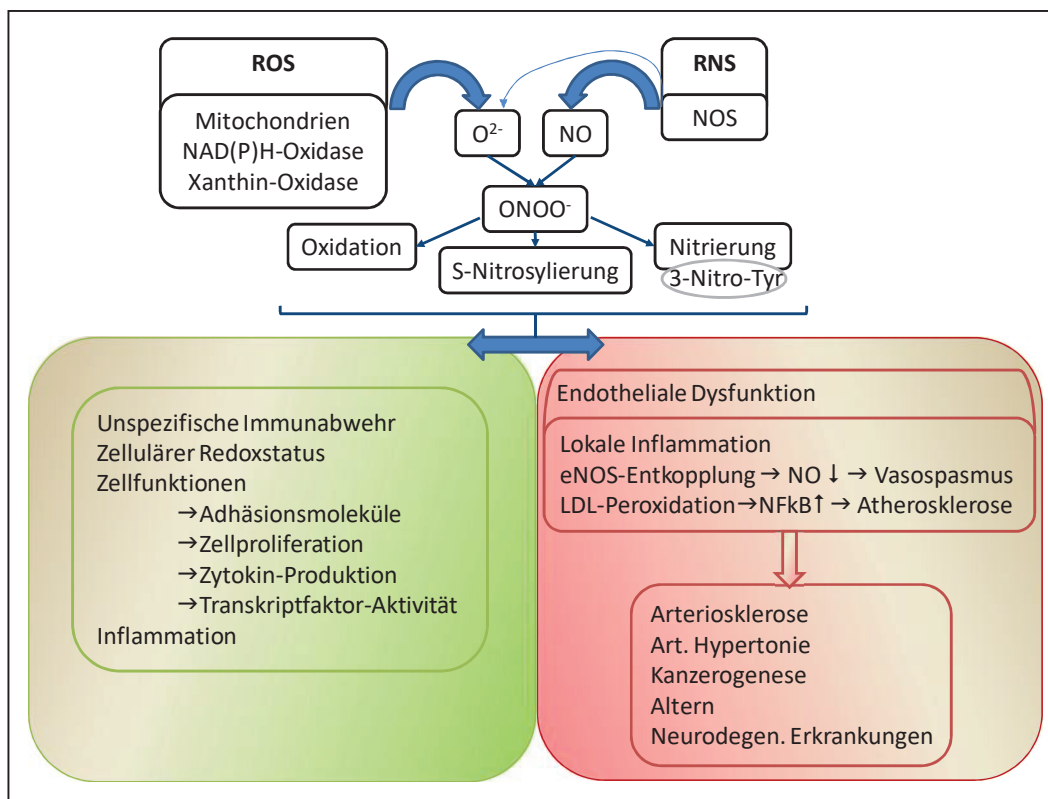
Desweiteren kann die „Entkopplung“ der endothelialen NOS (eNOS) durch die Oxidation von NO und die NADPH-abhängige Reduktion von  $O_2$  zu  $O_2^{\cdot-}$  zu oxidativem Stress beitragen (Näheres siehe Abschnitt 1.4.7) (148).

Die **physiologische Bedeutung** von ROS und RNS liegt in der unspezifischen Immunabwehr und in inflammatorischen Prozessen (150). Zum Bsp. werden von neutrophilen Granulozyten im Rahmen des sogenannten „*respiratory burst*“ große Mengen toxischer Spezies zur Bekämpfung invasiver Pathogene freigesetzt (150;159). Desweiteren kann die Funktion kardiovaskulärer Zellen grundlegend durch eine Veränderung des Redoxstatus beeinflusst werden (150). Dies betrifft bspw. die Zellproliferation, Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokin-Produktion und Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (159).

Unter physiologischen Bedingungen stehen den Zellen als Abwehrmechanismen gegen ROS oder RNS antioxidative Enzyme zur Verfügung (150). Zu den enzymatischen Antioxidantien zählen die Mangan-abhängige-Superoxid-Dismutase (Mn-SOD), Kupfer/Zink-Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD), Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase und Katalase.

Die Mn-SOD und Cu/Zn-SOD überführen Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) zu Wasserstoffperoxid, welches dann durch die Glutathion-Peroxidase oder Katalase zu Wasser überführt wird. Andere antioxidative Mechanismen beinhalten Radikal-Fänger (*scavenger*) wie Vitamin E, Betacarotin

und Vitamin C. Die Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien wird als „Redoxstatus“ einer Zelle bezeichnet (150).



**Abb. 4:** Entstehung von ROS bzw. RNS und physiologische sowie pathophysiologische Bedeutung

(3-Nitro-Tyr: 3-Nitro-Tyrosin, LDL: *low density lipoprotein*, NAD(P)H: Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (-Phosphat), NFκB: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, NO: Stickstoffmonoxid, NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superoxid-Anion, ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrit, RNS: *reactive nitrogen species*, ROS: *reactive oxygen species*)

#### 1.4.6 Der RNS-„Fußabdruck“: Protein-Tyrosin-Nitrierung

Durch oxidativen bzw. nitrosativen Stress werden posttranslationale Proteinmodifikationen hervorgerufen, zu denen neben Oxidations- und S-Nitrosylierungsreaktionen auch die Nitrierung von Tyrosin-Resten zählt (149) (Abb. 4). Das hierbei gebildete 3-Nitro-Tyrosin wird mittlerweile als „Fußabdruck“ der Peroxynitrit- bzw. RNS-Einwirkung anerkannt (161;162). Die zwei primären **Bildungsmechanismen** verlaufen a) nicht-enzymatisch über Peroxynitrit und b) Enzym-katalysiert durch Peroxidasen (u.a. Neutrophilen-Myeloperoxidase, Eosinophilen-Peroxidase) (161). Die in vivo-Tyrosin-Nitrierung entsteht in zwei Schritten durch die Addition einer Nitrogruppe an den in Proteinen enthaltenen aromatischen Tyrosinring (163). Ein alternativer Weg ist die Reaktion zwischen Tyrosyl-Radikal und Stickstoffmonoxid mit 3-Nitrosotyrosin als Intermediärprodukt. Diese Alternative wird bei Übergangsmetall-haltigen Proteinen, z.B. Cytochrom c, beobachtet, kann aber durch physiologische Reduktantien wie Glutathion in vivo verhindert werden (161).

Als **Folge der Protein-Tyrosin-Nitrierung** wird der  $pK_a$  (Säurestärke) der Tyrosin-Gruppe reduziert (von 10.1 auf 7.2), so dass bei physiologischem pH Nitro-Tyrosin nun eine negative Nettoladung aufweist (161;162). Daraus resultieren durch Beeinflussung der Sekundär- und Tertiärstruktur strukturelle Proteinveränderungen (161), die die Funktion der modifizierten Proteine beeinflusst (164).

Durch Proteom-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die **Tyrosin-Nitrierung ein hochselektiver Prozess** ist, welcher auf bestimmte Tyrosin-Reste innerhalb definierter Proteine beschränkt ist (60;156). Zum Beispiel besitzt die SERCA2a (Isoform der Calcium-ATPase im sarcoplasmatisch/endoplasmatischen Reticulum in langsam kontrahierenden Skelettmuskelfasern und im Herzen) insgesamt 18 Tyrosin-Reste, wobei sowohl in vivo als auch in vitro nur bestimmte davon nitriert werden (162;164).

Es werden diverse Faktoren einer Selektivität diskutiert: Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Protein tyrosinnitriert wird, steigt mit der Nähe zur Bildungsstätte nitrierender Spezies bzw. deren Diffusionsradius (164). Außerdem können Lipid-gelöste Tyrosin-Reste wahrscheinlicher nitriert werden als selbige in wässriger Phase, da nitrierende Spezies in lipophilem Mikromilieu akkumulieren (149). Von der Primärstruktur eines Proteins ausgehend verhindern die Aminosäuren Tryptophan, Cystein und Methionin in Nachbarschaft zu Tyrosin kompetitiv dessen Nitrierung (161). Bezüglich der Protein-Tertiärstruktur findet Tyrosin-Nitrierung aufgrund geringerer sterischer Hindernisse häufig in Schleifen-Regionen statt (161).

Die **Entfernung nitrierter Tyrosin-Reste** kann zum einen durch Degradation des gesamten betroffenen Proteins durch zelluläre proteolytische Systeme, wie Proteasome erfolgen (156;164). Dies gilt v.a. für funktionsveränderte Proteine, da nun eine Neusynthese notwendig ist, um funktionelle Defizite auszugleichen. Zum anderen gibt es reparative Mechanismen ohne den Abbau des betroffenen Proteins. Dazu werden Denitrasen diskutiert, welche die Nitro-Gruppe am Tyrosin-Rest entfernen und so eine Reversibilität der Tyrosin-Nitrierung implizieren (156;164;165). Es gibt einige wenige Berichte über denitrierende Mechanismen, bislang konnte jedoch keine explizite Denitraser nachgewiesen werden (162;165-167). Desweiteren wurde die Entfernung nitrierter Proteine durch immunologische Prozesse beschrieben, wobei eine Antikörperbindung zur Degradation des Proteins führt (156;164).

#### **1.4.7 Pathophysiologische RNS/ROS-Auswirkungen**

Unter pathophysiologischen Bedingungen werden RNS und ROS in erhöhten Mengen gebildet. Sie können verschiedene biologische Effekte durch in-/direkte Interaktionen mit zellulären Makromolekülen bewirken (z.B. mit DNA, Lipiden, Proteinen) (161) und zur Störung zellulärer Signalabläufe führen (151). Konsequenzen können z.B. irreversible Schäden an der Atmungs-

kette, Inhibition der ATP-Synthese und Cytochrom C-Freisetzung sein, aber auch die Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose oder Zellnekrose (146).

Übergeordnet kommt es bspw. zu inflammatorisch-pathologischen Vorgängen, Kanzerogenese und altersbedingten Veränderungen sowie neurodegenerativen Erkrankungen (60;161) (Abb. 4). Im Speziellen ist hier auch die Protein-Tyrosin-Nitrierung beteiligt (164).

Die **endotheliale Dysfunktion** ist eines der Schlüsselemente in der Radikal-vermittelten Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen (Abb. 4) (151;168). Durch endotheliale Dysfunktion werden z.T. recht paradoxe Reaktionen ausgelöst, die z.B. zu Vasospasmen und damit zu (relativen) Gefäßstenosen auch in Abwesenheit signifikanter Plaquebildungen führen (151). Die ROS aus Endothel, Adventitia und VSMC stammen hauptsächlich von der NAD(P)H-Oxidase (151). Aber auch die NOS tragen zur ROS-Entstehung in erheblichem Maße durch eine sog. „Entkopplung“ bei: Unter oxidativen Bedingungen entstehen bei verminderter Verfügbarkeit des Substrats L-Arginin und des Kofaktors BH4 (Tetrahydrobiopterin) vermehrt ROS, v.a. Superoxid (169). Proinflammatorische Reize und endothelialer Scherstress wie bei akuter Ischämie, Sepsis oder Herzinsuffizienz regen die NO-Bildung an (60;148;151). Superoxid und NO reduzieren unter Entstehung von Peroxynitrit die Bioverfügbarkeit von NO, wodurch die NO-Hauptwirkung, die Endothel-abhängige Vasorelaxation, aber auch andere protektive Effekte des NO abgeschwächt werden (151;169;170). Weiterhin wird durch die ROS- und RNS-Entstehung bei der eNOS-Entkopplung die Lipidperoxidation von LDL-Cholesterin gefördert, so dass im Rahmen einer Hyperlipoproteinämie die Atheroskleroseentstehung begünstigt wird (60;163;164;171). Ein durch oxidiertes LDL beeinträchtigter intrazellulärer Signalprozess ist bspw. die Aktivierung des induzierbaren, nukleären Transkriptionsfaktors NFκB (151). NFκB beeinflusst die Transkription von über 200 Genen, welche wiederum an der Atheroskleroseentstehung z.B. über lokale Inflammationsreaktionen oder Zytokin-Bildung beteiligt sind (151). Desweiteren ist die arterielle essentielle Hypertonie mit einer vermehrten ROS-Bildung verbunden (70;163).

Im Organismus können Plasmaproteine eine Tyrosin-Nitrierung aufweisen und sind quantitativ messbar (161). Dabei zeigt die erhöhte Menge nitrierter Plasmaproteine eine vermehrte Bildung oxidativen und nitrosativen Stresses an. Klinische Studien haben gezeigt, dass hohe Spiegel an nitrierten Plasmaproteinen eine starke Assoziation zur Inzidenz der koronaren Herzkrankheit aufweisen (KHK) (171) und die Nitro-Tyrosin-Menge durch Statin-Therapie gesenkt werden kann (171). Hierbei wird ein Augenmerk auf die Möglichkeit gelenkt, nitrierte Proteine als potentielle prognostische Risikomarker zu verwenden.

#### **1.4.8 RNS/ROS und Aldosteron/MR**

Es gibt einige Hinweise darauf, dass die MR-Aktivität durch nitro-oxidativen Stress bzw. einen veränderten zellulären Redoxstatus beeinflusst wird (59;61;66;70;129;172).

Zum Beispiel kann der zelluläre Redoxstatus die MR-Aktivität über die Beeinflussung des Steroid-Metabolismus modulieren. Die Konzentration der Nicotinamin-Kofaktoren NADPH/ NADP<sup>+</sup>, die bei der enzymatischen Cortisol-Inaktivierung durch die 11 $\beta$ -HSD2 notwendig sind, gestaltet sich abhängig von nitrosativem und oxidativem Stress, so dass die Enzymaktivität der 11 $\beta$ -HSD2 und somit die Verfügbarkeit affiner MR-Liganden (Cortisol vs. Aldosteron) beeinträchtigt wird (66).

Oxidativer Stress beeinflusst zudem die Proteinbiosynthese des MR. Dem liegt wahrscheinlich eine Translationsbeeinträchtigung auf Höhe der Elongation und Termination durch eine behinderte Aktivität des Elongationsfaktors 2 (EF-2) zugrunde (61). Desweiteren gibt es unterschiedliche Berichte über die Beeinflussung der Translokation des MR in den Zellkern unter oxidativen und nitrosativen Einflüssen (59;173). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Oxidation von Cystein-Gruppen am MR als posttranslationale Modifikation eine wichtige Rolle bei der Steroid-Bindung spielt und somit zu einer Inhibierung des Rezeptors führt (61;174).

Auch die MR-Wirkung wird durch oxidativen Stress verändert. Gekle et al. konnten anhand glatter Gefäßmuskelzellen, die den MR exprimieren, zeigen, dass Aldosteron bei gleichzeitiger Anwesenheit des ROS-Vertreters H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer verstärkten Kollagenbildung führt. Dies war bei der alleinigen Aldosteron-Gabe nicht zu beobachten. Es wird eine Beteiligung des MR über nicht-genotrope Signalwege (via EGFR) diskutiert (129). Damit wird das "Koinzidenz-Modell" verdeutlicht, dass Aldosteron nicht alleinig für eine pathologische MR-Aktivierung genügt, sondern dass zusätzliche Faktoren notwendig sind, wie bspw. eine erhöhte NaCl-Konzentration, ein erhöhter Blutdruck oder eben oxidativer Stress, der eng mit nitrosativem Stress vergesellschaftet ist (5;35;129).



## 2. Zielsetzung der Arbeit

Durch die medikamentöse Blockade des Mineralokortikoidrezeptors konnten sowohl Morbidität als auch Mortalität kardiovaskulär erkrankter Patienten gesenkt werden. Die pathophysiologischen Auswirkungen des aktivierten MR scheinen jedoch nur im Zusammenspiel mit anderen Faktoren zum Tragen zu kommen.

In dieser Arbeit sollte näher beleuchtet werden, inwiefern reaktive Stickstoffspezies (RNS), die als Stickstoffmonoxid-Abkömmlinge ebenfalls mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert werden, zum „Switch“ der MR-Aktivierung – von physiologischen hin zu pathologischen Einflüssen – beitragen. Hierfür erfolgte zunächst die Charakterisierung des Stickstoffmonoxid-Donors SNAP und des Peroxynitrit-Bildners Sin-1. Desweiteren wurde mit Hilfe von Zellkulturmodellen die Beeinträchtigung der Funktionalität des aktivierten MR durch nitrosativen Stress in Bezug auf die genomische Aktivität untersucht. Zusätzlich sollte der MR auf Proteinebene als direktes Ziel der Tyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit dargestellt werden.

Die Identifizierung und Beschreibung der koinzidenten Faktoren, die für die Signalkaskaden des MR eine Rolle spielen, hilft, die Zusammenhänge der pathophysiologischen MR-Auswirkungen auf das kardiovaskulorenale System zu verstehen.

## 3. Materialien und Methoden

### **3.1 Materialien**

Falls im Text nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), Calbiochem (Bad Soden) und BD Bioscience (Heidelberg) bezogen.

### **3.2 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1 Verwendete Zell-Linien**

Alle Zell-Linien wurden von ATCC (Manassas, Virginia, USA) bezogen.

HEK293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen epithelialen Ursprungs, die weder den MR (9) noch die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ -HSD2) (65) exprimieren. Kultiviert wurden sie mit DMEM/Ham's F-12-Medium (PAA, Pasching, Österreich), welches mit 10% fetalem Kälberserum (FCS; PAA, Pasching, Österreich) versetzt wurde, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

OK-Zellen sind eine epitheliale Zell-Linie aus dem proximalen Tubulus des Opossums. Wie die HEK293-Zellen exprimieren sie einen endogenen GR, jedoch keinen endogenen MR oder eine 11 $\beta$ -HSD2 (175;176). Sie wurden in MEM with Earle's Salts-Medium plus 10% FCS kultiviert (PAA, Pasching, Österreich).

#### **3.2.2 Zellkultivierung**

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte 1x wöchentlich. EDTA-, 0,1%ige Trypsin- und Nährmedium-Lösung wurden auf 37°C vorgewärmt. Das verbrauchte Medium wurde von den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit EDTA-Puffer (Tab. 1) gewaschen (z.B. 6 ml EDTA-Puffer bei einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser), um Reste Trypsin-inhibierenden Serums zuverlässig zu entfernen. Auf besagte Petrigröße wurde der Zellrasen mit 1 ml 0,1%iger Trypsin-Lösung (Tab. 1) überschichtet. Eine wenige Minuten dauernde Inkubation im Brutschrank förderte den Andau der Zell-Zell-, bzw. Zell-Oberflächen-Kontakt-Proteine. Mit 10 ml Serum-haltigem Medium (= versetzt mit 10% fetalem Kälberserum) wurde die Trypsin-Wirkung abgestoppt. Die Lösung wurde mit einer Pipette mehrfach suspendiert, um Zellen voneinander zu trennen. Je nach weiterem Versuch oder Kultivierung wurde die Suspension in das dafür notwendige sterile Gefäß eingesät. Jeweils 24 h vor einem Experiment erfolgte die Umstellung auf Serum- und Zusatz-freies Medium, um eine unspezifische Stimulation durch im Serum enthaltene Substanzen zu vermeiden und um die Zellen zu synchronisieren.

**Tab. 1:** Verwendete Reagenzien und deren Bestandteile für die Zellkultivierung

Reagenz	Bestandteile
EDTA-Waschpuffer	0,54 mM EDTA; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin-Lösung	0,54 mM EDTA; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 g/l Trypsin; pH 7,1-7,3 mit HCl

### **3.2.3 Transiente Zelltransfektion**

Die Zelltransfektion stellt eine Möglichkeit dar, DNA in Form von Plasmiden in eine Zelle zu schleusen, die diese ursprünglich nicht besaß. Transiente im Gegensatz zu stabiler Transfektion bedeutet, dass nur die Zellen einer Subkultur für den jeweiligen Versuch transfiziert wurden. Die Mutterzellkultur dagegen blieb von der Plasmidtransfektion ausgeschlossen.

Die Transfektion der HEK293-Zellen wurde mit Qiagen Polyfect Reagenz (Qiagen, Hilden) gemäß Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Pro 0,05 µg DNA wurde in der Regel 1 µl Polyfect Reagenz verwendet. Das Prinzip beruht auf der DNA-Kondensation und –Ummantelung mit sphärischen Strukturen, so dass positiv geladene Polyfect-DNA-Komplexe entstehen, die mit negativ geladenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren und damit in die Zelle aufgenommen werden können.

Die Transfektion der OK-Zellen erfolgte mit dem Qiagen Effectene Reagenz (Qiagen), ebenfalls gemäß Herstelleranweisungen. Auf 0,05 µg DNA wurde hierbei 1,5 µl Effectene Reagenz verwendet. Das Prinzip ist ähnlich wie beim Polyfect Reagenz.

### **3.2.4 Verwendete Plasmide für die transienten Transfektionen**

Als Plasmide wurden verwendet: pEGFP-C1-hMR (humaner Mineralokortikoidrezeptor, der an EGFP gekoppelt ist; N. Farman, Paris) (177), pEGFP-C1 (ein EGFP-kodierender Kontrollvektor, der vorrangig als interne HEK293-Transfektionskontrolle diente; Clontech), pcDNA3.1-His-LacZ (der hauptsächlich für Reporter-Gen-Assays mit OK verwendete Kontrollvektor, der u.a. für β-Galaktosidase kodiert; Invitrogen, Darmstadt), pcDNA3.1 (Kontrollplasmid insbesondere für ELISA-Negativkontrollen; Invitrogen), pcDNA3.1-HisC-hMR (Expressionsvektor für den humanen Mineralokortikoidrezeptor, der zusätzlich ein Xpress-Epitop kodiert) (176).

## **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten**

Für den Reporter-Gen-Assay wurden die Zellen nach Abnahme des Zusatz-haltigen Mediums mit 100 µl je Ansävertiefung bzw. well der 24-well-Platte MOPS/Triton-X-100-Lysepuffer (20 mM MOPS = 3-N-Morpholinopropansulfonsäure + 0,1% Triton-X-100, Tab. 2) für 30 min inkubiert. Das Lysat wurde vom Boden mit einem Zellschaber abgekratzt, in Reaktionsgefäße (Eppendorf,

Hamburg) überführt und für 10 min bei 13'800 g (Zentrifuge: Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific, Braunschweig) zentrifugiert.

Die für den Western Blot benötigten Zellen wurden mit kaltem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Tab. 2) gewaschen und für 30 min auf Eis mit 100 µl ERK-Lysepuffer (für HEK293-Zellen, Tab. 2) bzw. 150 µl CST-Lysepuffer (für OK-Zellen, Tab. 2) je 3 cm-Durchmesser Petrischale inkubiert. Die Zellen bzw. das Lysat wurden vom Untergrund abgeschabt, mehrfach mit einer Pipette suspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. Die Zentrifugation für 15 min bei 13'800 g bei 4°C trennte das Sediment vom Überstand.

Das Sediment wurde jeweils verworfen, mit dem Überstand wurden die BCA-Proteinbestimmung bzw. die Transfektionskontrolle durchgeführt.

**Tab. 2:** Verwendete Reagenzien und deren Bestandteile zur Herstellung von Zell-Lysaten

Reagenz	Bestandteile
<b>Triton-X-100-Lysepuffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 200 µM Na-Orthovanadat; 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µM Pepstatin A; 40 mg/l Betastatin; 2 mg/l Aprotinin; 1% Triton X-100; pH 7,4
<b>ERK-Lysepuffer</b>	0,1% Triton-X-100 in PBS; 0,2 mM Na-Orthovanadat; Proteasehemmermix (1:500)
<b>CST-Lysepuffer (gemäß Cell Signaling Technology)</b>	20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Triton-X-100; Proteasehemmermix I von Calbiochem; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM Na-Orthovanadat; 2,5 mM Na-Pyrophosphat; 1 mM β-Glycerolphosphat
<b>PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)</b>	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; H <sub>2</sub> O; pH 7,4 mit HCl

### **3.3.2 Bestimmung des Proteingehaltes**

#### BCA - Bicinchoninsäure-Methode (178)

Die Bestimmung des Proteingehaltes mit 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) ist eine Färbemethode, welche die Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch die Peptidbindungen der Proteine beinhaltet. BCA chelatiert Cu<sup>+</sup>-Ionen mit sehr hoher Spezifität und bildet so einen wasserlöslichen violett-farbenen Komplex. Sie ist direkt proportional zur Proteinkonzentration. Zur Bestimmung wurden 5 µl des Zell-Lysates in eine transparente 96-well-Mikrotiterplatte überführt. Dazu wurden 300 µl des BCA-Reagenz (bestehend aus Reagenz A (Uptima, Montluçon, Frankreich) und B (4% CuSO<sub>4</sub>) im Mengenverhältnis 50 + 1) gegeben, bei 37°C für 30 min im Wasserbad inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm gemessen. Der Proteingehalt der Probe wurde anhand eines Proteinstandards (100, 300, 500, 700 µg BSA/ml bidestilliertem Wasser in Doppelbestimmung) ermittelt.

### Trypanblaufärbung

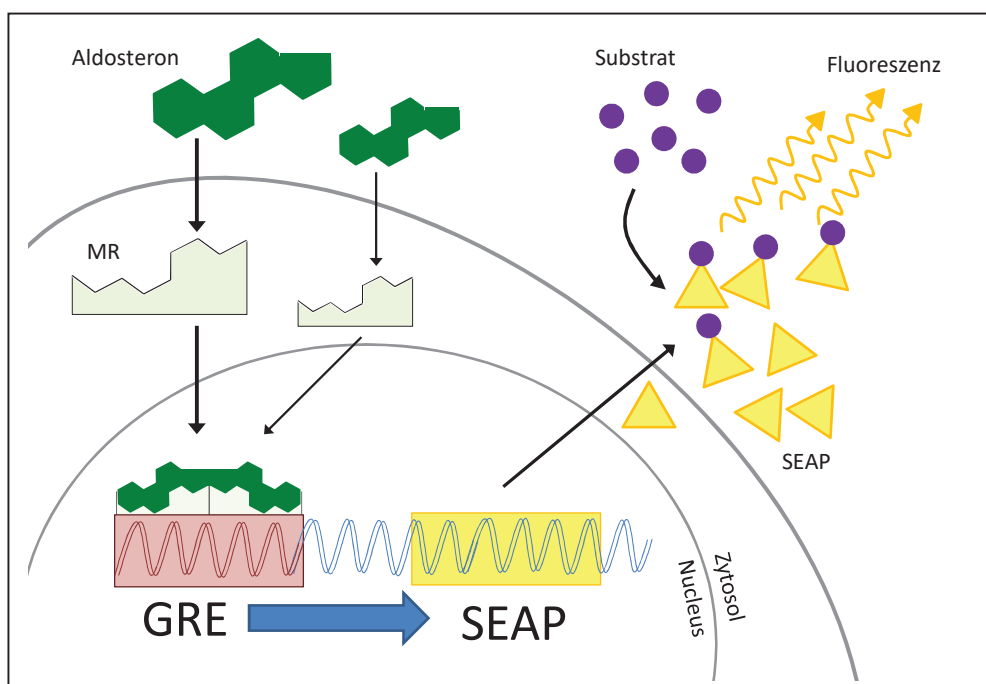
Durch Färbung mit Trypanblau wurde der Proteingehalt der Zellen in den wells der 96-well-Mikrotiterplatten bestimmt. Nach der Immundetektion wurden die wells dreimalig mit PBS gewaschen und dann 5 min bei 37°C mit 50 µl einer 0,2%igen Trypanblaulösung inkubiert. Viermaliges Waschen mit PBS entfernte Farbstoffüberschüsse. Danach wurden die Zellen durch Schütteln mit 50 µl einer 1%igen SDS-Lösung (in PBS) für 30-60 min bei Zimmertemperatur lysiert und die Absorption bei 560 nm bestimmt.

### **3.3.3 Reporter-gen-Assay**

#### 1. Prinzip des Reporter-gen-Assays

Die genomische Wirkung des Mineralokortikoidrezeptors wurde indirekt mit dem Mercury Pathway Profiling System (Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA) bestimmt. Dabei kam der pGRE-SEAP-Vektor (Abb. 5) zum Einsatz, der das Hormon-responsive Element GRE und nachgeschaltet DNA zur Transkription der Sekretorischen Alkalischen Phosphatase (SEAP) besitzt. In Abhängigkeit von der Transaktivierung des GRE-Promotors durch den aktivierten MR – die sogenannte hMR-Transaktivierungsaktivität – wird das Enzym SEAP exprimiert und nach extrazellulär sezerniert. Zur Ermittlung der Enzym-Aktivität wird diesem ein Substrat angeboten, wonach die Zunahme eines fluoreszierenden Produktes ermittelt wird.

Da HEK293- und OK-Zellen keinen endogenen MR exprimieren, wurde in sie zusätzlich ein MR-haltiger Vektor oder ein Leervektor als Kontrolle transfiziert.



**Abb. 5:** Prinzip des GRE-SEAP-Reporter-gen-Assays

(GRE: Glukokortikoid-responsives Element, SEAP: (Gen für die) sekretorische alkalische Phosphatase, MR: Mineralokortikoidrezeptor)

## 2. Transfektion für Reporter-Gen-Assay

Für den Reporter-Gen-Assay wurden die Zellen in 24-well-Multiwellplatten angesät. HEK293- und OK-Zellen wurden mit der entsprechenden DNA mithilfe des Polyfect bzw. Effectene Reagenz transfiziert. Die Transfektion erfolgte in Serum- und Zusatz-freiem Medium für 24 Stunden bei 37°C. Anschließend erfolgte die Umstellung auf das Serum-freie Medium, welches je nach Fragestellung mit den entsprechenden Zusätzen versetzt war (z.B. Aldosteron, Sin-1, SNAP usw.). Anschließend erfolgte die Inkubation für 6, 24 oder 48 Stunden im Brutschrank.

## 3. Bestimmung der Aktivität der Sekretorischen Alkalischen Phosphatase

Für die Bestimmung der SEAP-Aktivität im Medium wurden 60 µl des Kulturmediumüberstandes mit 60 µl SEAP-Puffer (Tab. 3) in Reaktionsgefäßen gemischt und bei 65°C für 30 min im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt, um die Reaktion abzustoppen. Um die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase zu detektieren, wurde mit dem AttoPhos-System von Promega (Mannheim) gearbeitet. Je 100 µl des Inkubates und 100 µl AttoPhos-Lösung (0,6 mg AttoPhos / ml AttoPhos-Puffer) wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Zunahme der Fluoreszenz bei 440 nm Anregung und 560 nm Emission bis zu 1 h bei Raumtemperatur verfolgt (Tecan Infinite, Männedorf, Schweiz).

## 4. Interne Transfektionskontrolle: EGFP-Fluoreszenz

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde entweder das Plasmid pEGFP-C1, welches das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) -Gen konstitutiv exprimiert, oder das Plasmid pcDNA3.1-His-LacZ, welches das Gen für  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, verwendet und zusammen mit dem SEAP-Reporter transfiziert.

EGFP ist die modifizierte Variante eines in der Qualle *Aequorea victoria* natürlich vorkommenden, durch Autokatalyse fluoreszierenden Proteins (179). 60 µl des Zell-Lysates je well wurden in transparente 96-well-Mikrotiterplatten überführt, mit 485 nm Extinktion im Fluoreszenzphotometer angeregt und die Emission bei 535 nm gemessen.

## 5. Interne Transfektionskontrolle: $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Die Expression des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase wurde kolorimetrisch gemessen. Es hydrolysiert das Substrat o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (ONPG), wobei das gelb gefärbte Produkt o-Nitrophenol photometrisch ermittelt werden kann. Zu 10 µl je well des Zell-Lysates wurden 50 µl Cleavage-Puffer (Tab. 3) und 20 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml) gegeben und für 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 125 µl 1 M Natriumcarbonat beendete die Reaktion. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

**Tab. 3:** Verwendete Reagenzien und deren Bestandteile beim Reportergen-Assay

Reagenz	Bestandteile
<b>SEAP-Puffer</b>	60 mM L-Homoarginin; 3 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,2 mM ZnCl <sub>2</sub> ; 100 mM Tris-HCl (pH 9,3)
<b>Cleavage-Puffer</b>	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; 40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O; 10 mM KCl; 1 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O; pH 7; auf 100 ml Cleavage-Puffer 270 µl 14,3 M β-Mercaptoethanol

### 3.3.4 SDS-PAGE-Gelelektrophorese und Western Blot

#### 1. Proteindenaturierung und -auftragung

Die für den Western Blot benötigten Zellen (HEK293 oder OK) wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 3 cm angesät, transfiziert, mit Zusätzen behandelt und lysiert. Vor Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die Zell-Lysate immer mit Lämmli-Puffer (Tab. 7) im Verhältnis 1:1 entweder bei 37°C für 30-40 min oder bei 95°C für 5 min mit dem Ziel der Protein-Denaturierung inkubiert.

#### 2. Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, um Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts aufzutrennen. Das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine durch Zerstörung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur und umhüllt sie so, dass ihre ursprüngliche Eigenladung durch die negative Ladung des SDS überdeckt und vereinheitlicht wird. Im elektrischen Feld werden die Proteine anhand ihrer Größe im Polyacrylamid-Gel getrennt. Dazu werden Polyacrylamid-Gele hergestellt, deren unterer, größerer Teil aus dem Trenngel und deren oberer, kurzer Abschnitt aus dem Sammelgel mit Einfülltaschen für die Proben besteht. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Bestandteile kann die Vernetzung des Trenngels je nach Molekulargewicht des gesuchten Proteins eingestellt werden (Tab. 4).

**Tab. 4:** Bestandteile der Polyacrylamid-Gele für Western Blot

Sammelgel (ml pro ein Gel)		Trenngel (ml pro ein Gel)		
		12%	10%	8%
3%				
0,288	<b>Acrylamid / Bis 26 : 0,7</b>	-	-	-
-	<b>Acrylamid / Bis 29.3 : 0,53</b>	2,550	2,140	1,715
0,030	<b>APS 10 %</b>	0,075	0,075	0,075
0,025	<b>SDS 10 %</b>	0,125	0,125	0,125
0,625	<b>0,5 M Tris-HCl; pH 6,8</b>	-	-	-
-	<b>1,5 M Tris-HCl; pH 8,8</b>	1,563	1,563	1,563
1,540	<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,880	2,285	2,713
0,01	<b>TEMED</b>	0,02	0,02	0,02

Die Gele wurden in vertikale Elektrophoresekammern (Bio-Rad, München) eingespannt, die mit Laufpuffer (Tab. 7) aufgefüllt wurden und an die für 36 min ein Strom von 11 mA/Gel und anschließend für 1 h 48 min ein Strom von 20 mA/Gel angelegt wurde. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard mit bekanntem Molekulargewicht verwendet (PeqLab, Erlangen).

### 3. Proteintransfer auf Nitrozellulose-Membranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel (Kathoden-nahe) auf eine Nitrozellulose-Membran (Anoden-nahe) (Whatman/Biometra, Göttingen) in einem entsprechenden Gerät (Biometra, Göttingen) im sogenannten Semi-dry-Verfahren. Zwischen den Elektrodenblättern und dem Gel/der Membran befanden sich je 2 Filterpapiere (A. Hartenstein, Würzburg), die mit Transferpuffer (Tab. 7) getränkt waren. Der Transfer dauerte 30 min bei einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche.

### 4. Transferkontrolle mittels Ponceau S

Direkt nach dem Proteintransfer auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte die Färbung der Proteine, um den Erfolg des Transfers zu kontrollieren. Die Membran wurde dafür 1 min in Ponceau-Färbelösung (Tab. 7) geschwenkt und danach mit bidestilliertem Wasser gespült. Die rosarote Färbung der Proteine wurde nach der Dokumentation mit salzhaltigem Puffer entfernt (hier wurde TBS verwendet; TBS = Tris-gepufferte Salzlösung, Tab. 7), wodurch die Membran für die weiteren Schritte verwendbar wurde.

### 5. Immundetektion

Zuletzt erfolgte die Detektion des gesuchten Proteins mittels entsprechender Antikörper. Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran 5 min in einfach konzentriertem TBS gewaschen. Die Inkubation für 1 h in Blocking-Solution (Tab. 7) diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Überschüssige Blocking-Solution wurde durch dreimaliges Waschen in TBS/Tween 0,1% entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Tab. 5) über Nacht bei 4°C in Antikörper-Verdünnungslösung (Tab. 7) unter Schütteln. Der erste Antikörper bindet spezifisch an das gesuchte Protein.

**Tab. 5:** Für Western Blot verwendete Erstantikörper und deren Verdünnung

Erstantikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen anti-EGFP	1 : 500	Santa Cruz Biotechnology
Maus anti-Nitrotyrosin	1 : 500	Santa Cruz Biotechnology
Maus anti-Xpress	1 : 5.000	Invitrogen

**Tab. 6:** Für Western Blot verwendete Meerrettich-Peroxidase-(HRP)-gekoppelte Zweitantikörper und deren Verdünnung

Zweitantikörper (HRP-gekoppelt)	Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen IgG	1 : 2.000	Cell Signaling Technology
anti-Maus IgG	1 : 2.000	Cell Signaling Technology



Am Folgetag wurde die Membran zum Entfernen überschüssiger, nicht gebundener Antikörper dreimalig in TBS/Tween 0,1% für je 5 min gewaschen. Schließlich folgte die Inkubation mit Zweitantikörper (Tab. 6) für  $\geq 60$  min in Blocking-Solution. Der Zweitantikörper (IgG) bindet an den Erstantikörper und ist an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Es folgte wieder dreimal 5 min Waschen in einfach konzentriertem TBS, dann einmaliges Waschen in destilliertem Wasser.

Die Detektion der Antikörper-markierten Proteine erfolgte mit dem chemilumineszierenden ECL-Reagenz (Thermo Scientific, Braunschweig). Hierfür wurden die Peroxid-haltige Reagenz-Lösung 1 und die Luminol Enhancer-Reagenz-Lösung 2 gemäß Herstellerempfehlung im Verhältnis 1:1 gemischt und gleichmäßig auf die Membran gegeben. Das Reagenzgemisch stellt das Substrat für die Meerrettich-Peroxidase dar und wird durch deren Aktivität in lumineszierende Produkte umgesetzt, deren Lumineszenz mittels des Membrandokumentationssystems von Biorad und dem Programm Quantity One (Chemi Doc XRS-System; Biorad, München) bestimmt wurde.

#### 6. Gelfärbung mit Coomassie-Blau

Die im Gel enthaltenen Proteine wurden für 10-15 min in Fixierlösung (Tab. 7) fixiert.

Anschließend wurden sie in Coomassie-Färbelösung (Tab. 7) für 2 h bei Zimmertemperatur geschwenkt. Es folgte das Entfärben in 10%iger Essigsäure für ca. 1 h.

**Tab. 7:** Verwendete Reagenzien und deren Bestandteile für SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Reagenz	Bestandteile
<b>Lämmli-Puffer</b>	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 % SDS (w/v); 1,4 M 2-Mercaptoethanol; 10 % Glycerol (v/v); 0,01 % Bromphenolblau (w/v); pH 7,4 mit NaOH
<b>Elektrodenpuffer</b>	25,6 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS; 192 mM Glyzin; H <sub>2</sub> O auf 1 l
<b>Transferpuffer</b>	20% Methanol; 25 mM Tris; 192 mM Glyzin; H <sub>2</sub> O auf 1 l
<b>10 x Ponceau-Färbelösung</b>	26 mM Ponceau-S-Farbstoff; 30% Trichloressigsäure (w/v); 1,18 mM Sulfosalicylsäure
<b>10 x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)</b>	50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,6 mit HCl
<b>Blocking Solution</b>	1 x TBS; 0,1% Tween-20; 5% fettfreies Milchpulver
<b>Antikörper- Verdünnungslösung</b>	1 x TBS; 0,1% Tween-20; 5% BSA (bovines Serumalbumin)
<b>Fixierlösung</b>	25% Isopropanol; 10% Essigsäure; 65% H <sub>2</sub> O
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	10% Essigsäure; 0,006% Coomassie G-250 (w/v)

### **3.3.5 ELISA (Enzyme linked Immuno sorbent Assay)**

Die Versuche mittels Direkt-ELISA bieten die Möglichkeit, Proteine in geringen Konzentrationen nachzuweisen.

Für den anti-EGFP-Direkt-ELISA wurden Versuche mit HEK293- und OK-Zellen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1) transfiziert wurden. Nach der Transfektion wurden die Zellen in sterile 96-well-Mikrotiterplatten angesät und mit Inkubationslösung ± Zusätzen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dem für den Versuch notwendigen Zeitraum wurde der Überstand von den Zellen abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit 4%igem Paraformaldehyd in TBS für 60 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie dreimal mit Permeabilisierungspuffer (Tab. 10) für je 5 min gewaschen und anschließend 20 min mit Permeabilisierungspuffer + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,6%) inkubiert. Es folgte nochmals dreimaliges Waschen mit Permeabilisierungspuffer für je 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend folgte die Inkubation mit 10% fetalem Kälberserum in Permeabilisierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen. Über Nacht wurden die Proben mit Erstantikörper (Tab. 8) in Antikörper-Verdünnungslösung (5% BSA in Permeabilisierungspuffer) bei 4°C inkubiert.

**Tab. 8:** Für ELISA verwendete Antikörper und deren Verdünnung

<b>Erstantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Kaninchen anti-EGFP	1 : 2.000	Santa Cruz Biotechnology
<b>Zweitantikörper (HRP-gekoppelt)</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
anti-Kaninchen-IgG	1 : 20.000	Cell Signaling Technology

Daraufhin wurde dreimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die Probe für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper (Tab. 8) in Antikörper-Verdünnungslösung inkubiert.

Es wurde wiederum dreimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, gefolgt von dreimaligem Waschen für je 5 min mit TBS. Schließlich wurden die Proben für 15 min mit HRP-Substrat (Tab. 9) im Dunkeln inkubiert und anschließend wurde die Absorption bei 492 nm bestimmt. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde nochmals bei 492 nm gemessen. Der Proteingehalt eines wells wurde mit Hilfe der Trypanblaufärbung (siehe oben) bestimmt.

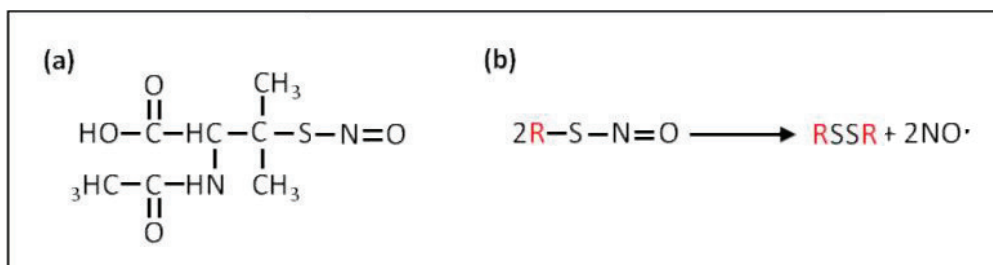
**Tab. 9:** Verwendete Reagenzien und deren Bestandteile für ELISA

<b>Reagenz</b>	<b>Bestandteile</b>
<b>Permeabilisierungspuffer</b>	0,1% Triton-X-100 in TBS; 37 mg/l Na-Orthovanadat
<b>HRP-Substrat-Lösung</b>	4,6 mM o-Phenylendiamin; 67,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O + 38 mM Zitronensäure; 0,015 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### **3.4 Bestimmung der Stickstoffmonoxid-Freisetzung und Peroxynitrit-Bildung**

#### **3.4.1 Nitrit-Assay mittels Griess-Reaktion**

Die NO-Freisetzung der NO-Donoren 3-Morpholinosydnonimin (Sin-1; Calbiochem) und S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin (SNAP; Invitrogen) (Abb. 6 und 7) wurde mittels Griess-Methode bestimmt (180). Benannt ist diese Methode nach dem deutschen Chemiker J. P. Griess und wurde um 1879 das erste Mal verwendet (181). Es ist eine spektrophotometrische Bestimmung des Nitritgehaltes einer wässrigen Lösung, wodurch auf die Menge des gebildeten NO geschlossen werden kann. Das Griess-Reagenz besteht aus Sulfanilamid, Naphthylethylen-diamin und Phosphorsäure. Das in der Probe enthaltene Nitrit reagiert mit Sulfanilamid zu einem Diazonium-Kation, das an das aromatische Amin 1-Naphthylethyldiamin gekoppelt wird, wobei ein rotvioletter Azofarbstoff entsteht (153). Die Reaktion ist spezifisch für Nitrit. Das fertige Griess-Reagenz (40 mg/ml H<sub>2</sub>O) wurde mit in Zusatz-freiem Zellkulturmedium gelöstem Sin-1 bzw. SNAP im Verhältnis 1:1 in 96-well-Mikrotiterplatten gemischt und für ≥ 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert (180). Danach wurde die Absorption bei 535 nm mittels eines Mikrotiterplattenlesesystems (Tecan Sunrise, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Eine Nitrit-Standardkurve wurde erstellt, anhand derer der Nitrit-Gehalt der Proben kalkuliert wurde. Dafür wurde eine 1 mM Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>)-Lösung mit H<sub>2</sub>O auf 1 µM, 10 µM, 30 µM und 100 µM verdünnt und ebenfalls die Absorption gemessen.

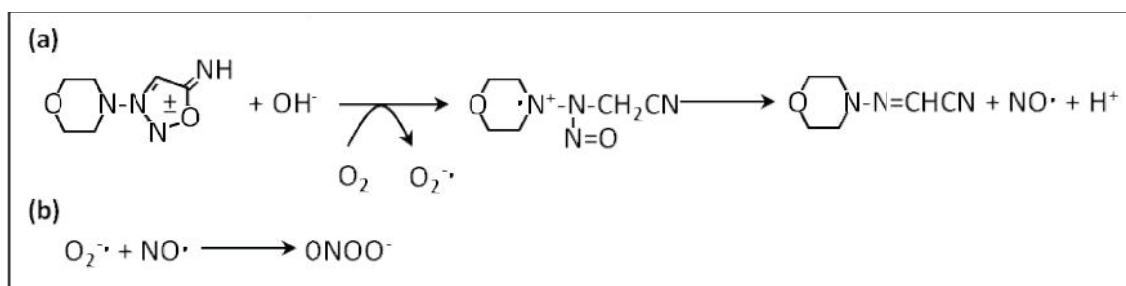


**Abb. 6:** (a) Strukturformel von SNAP (182) und (b) NO-Freisetzung aus SNAP (183)

#### **3.4.2 Antikörpervermittelte Nitro-Tyrosin-Detektion als Hinweis für Peroxynitrit-Bildung**

Als Nebenprodukt setzt der NO-Donor Sin-1 nicht nur Stickstoffmonoxid, sondern auch Sauerstoff-Radikale, sogenannte Superoxid-Anionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) frei (Abb. 7). Aufgrund der relativ kurzen Entfernung der Radikale können beide miteinander reagieren und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) bilden. Peroxynitrit ist schließlich in der Lage, das in Peptidverbindungen enthaltene Tyrosin unter Bildung von 3-Nitro-Tyrosin zu nitrieren (184). Um dieses Prinzip zu testen, wurde ein Tyrosin-haltiges Zielprotein (bovines Serumalbumin; BSA) in einem Stickstoffmonoxid- bzw. Peroxynitrit-haltigem Milieu inkubiert und die 3-Nitro-Tyrosin-Bildung mittels spezifischer Antikörper bestimmt.

Hierfür wurde bovines Serumalbumin in Serum- und Zusatz-freiem Zellkulturmedium gelöst (1000 mg/l). Diese Lösung wurde zusätzlich zu einer Endkonzentration von 1mM mit Sin-1 als Peroxynitrit-Donor oder SNAP als NO-Donor versetzt und für 1 bzw. 24 Stunden bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Anschließend erfolgte mit jeweils 10 µl der Lösung die Aufarbeitung für eine SDS-PAGE-Gelelektrophorese mit folgendem Western Blot unter Verwendung des 3-Nitro-Tyrosin-Antikörpers.



**Abb. 7:** (a) Strukturformel von Sin-1 mit NO- und O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Freisetzung (183). (b) Bildung von Peroxynitrit aus NO und O<sub>2</sub><sup>-</sup> (60)

### **3.5 Statistische Auswertung**

Alle Daten sind als Mittelwerte ± SEM (*standard error of the mean* = Standardfehler) angegeben. Statistische Signifikanz eines Unterschiedes wurde mittels Student-T-Test (gepaart oder ungepaart) getestet. Unterschiede wurden als signifikant gewertet bei  $p < 0,05$ . Die statistische Datenauswertung und Graphikbearbeitung erfolgte mit Microsoft Excel 2007 und Sigma Plot 8.0. Es wurden Zellen von mindestens zwei verschiedenen Passagen für jede experimentelle Serie genutzt.

Die Textverarbeitung erfolgte mit Microsoft Word 2007, die Erstellung von Abbildungen zusätzlich mit Microsoft Power Point 2007. Die zitierte Literatur wurde mit dem Reference Manager 10 von Thomson Reuters verwaltet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Darstellung des humanen Mineralokortikoidrezeptors (hMR) auf Proteinebene

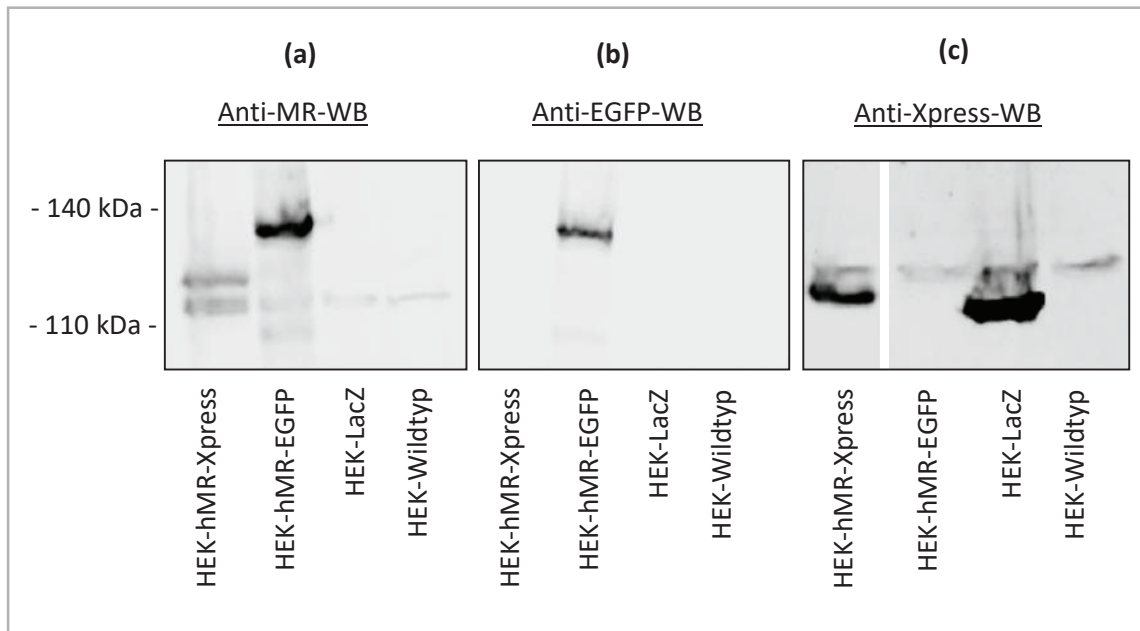
#### 4.1.1 Darstellung des hMR auf Proteinebene in HEK293-Zellen nach Transfektion

Da in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit auf funktionelle Aspekte des Mineralokortikoidrezeptors getestet werden sollte, war es zunächst wichtig zu zeigen, dass die dabei zu verwendenden Zellen (HEK293- bzw. OK-Zellen) tatsächlich mit Plasmidvektoren, die bspw. den hMR enthalten, transfiziert werden können. Die HEK293-Zelllinie wurde verwendet, da sie in MR-Versuchsmodellen weit verbreitet und auch etabliert ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass in ihnen der MR endogen nicht nachweisbar ist (128). Demnach kann man „beliebig“ die DNA zur Expression des hMR-Proteins mittels Transfektion in die HEK293-Zellen einschleusen. Der im Rahmen dieser Arbeit meist verwendete Expressionsvektor war pEGFP-C1-hMR (siehe auch Materialien und Methoden, Abschnitt 3.2.4). Das Protein, welches mittels dieses Plasmids exprimiert wird, ist der hMR mit einem EGFP-Fähnchen (47), das insgesamt eine Größe von 122 kDa besitzt.

Zum Nachweis der Expression des MR in HEK293-Zellen wurden diese entweder gar nicht transfiziert („HEK-Wildtyp“), nur mit Kontrollvektor und Vehikellösung transfiziert (Plasmid: pcDNA3.1-His-LacZ; „HEK-LacZ“) oder mit dem pEGFP-C1-hMR-Vektor („HEK-hMR-EGFP“) oder mit einem hMR-DNA-Vektor mit Xpress-Fähnchen (Plasmid: pcDNA3.1-HisC-hMR; „HEK-hMR-Xpress“) transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen, in der die Zellen Zeit hatten, das gewünschte Protein zu exprimieren, wurden die Zellen „geerntet“ und für den Western Blot aufbereitet. Dafür wurde ein Primär-Antikörper verwendet, der gegen den MR selbst gerichtet war (Abb. 8(a)). Es war zu beobachten, dass endogen, also ohne Plasmid-Transfektion, kein MR exprimiert wurde, so dass in der Spur der HEK-Wildtyp-Zellen (ohne jegliche Transfektion) und HEK-LacZ-Zellen (mit dem LacZ-Plasmid transfizierte Zellen, welcher keinen MR beinhaltet) keine Bande nachzuweisen war. Der Größenunterschied der nachgewiesenen, MR-haltigen Proteine („HEK-hMR-Xpress“ und „HEK-hMR-EGFP“) ergibt sich aus der Größe der angefügten Fähnchen-Proteine Xpress bzw. EGFP.

Mit den selben Zellproben ließ sich durch Verwendung eines gegen EGFP gerichteten Primärantikörpers zeigen, dass nach Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-C1-hMR der hMR samt EGFP-Fähnchen exprimiert wurde (Abb. 8(b)).

Vom Prinzip her ähnlich wurde das Experiment mit einem Primärantikörper durchgeführt, der gegen das Xpress-Fähnchen gerichtet ist (Abb. 8(c)). Nur die Zellen, die mit dem DNA-Vektor zur Expression des Xpress-Fähnchens inkubiert wurden, zeigten eine Bande im Western Blot. Zusätzlich zeigte sich in allen Zellen, auch in den nicht-Xpress-transfizierten Zellen, eine zarte Bande auf stabiler Höhe von ~ 110 kDa, die als unspezifisch gewertet wurde. Der Antikörper ist zwar monoklonal, Interaktionen mit Peptidsequenzen, die der Erkennungssequenz -Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys- gleichen oder ähneln, sind dennoch denkbar.



**Abb. 8:** Nachweis der Protein-Expression in transfizierten HEK293-Zellen.

**(a)** Nachweis der MR-Expression. Zellen, die mit einem Plasmid transfiziert wurden, das zur Expression von hMR führte, exprimierten den (h)MR, während er bei Wildtyp-Zellen (HEK-Wildtyp) und Zellen, die mit dem Kontrollplasmid (HEK-LacZ) transfiziert wurden, nicht nachweisbar war.

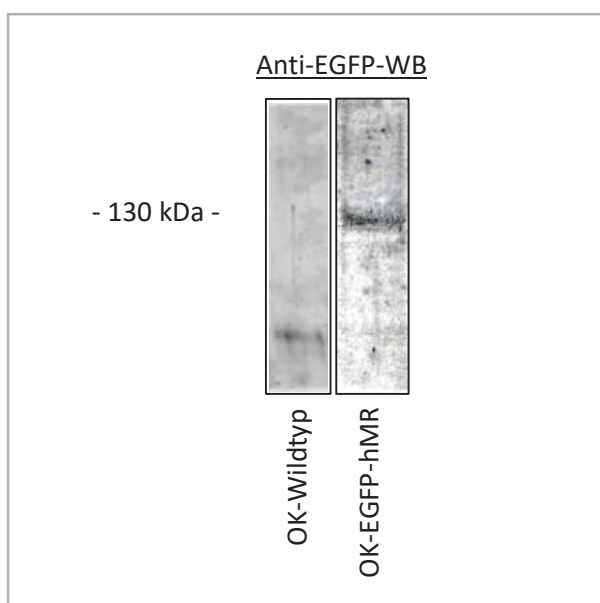
**(b)** Nachweis der EGFP-Expression. HEK293-Zellen wurden wie in (a) gezeigt transfiziert. Anschließend wurde mittels anti-EGFP-Primärantikörper die Expression des EGFP untersucht. Es ließ sich nur in Zellen, die mit dem EGFP-hMR transfiziert worden waren, auf Höhe des EGFP-hMR eine Bande nachweisen, während bei allen anderen kein Nachweis möglich war.

**(c)** Nachweis der Expression des an den hMR gekoppelten Xpress-Fähnchens. HEK293-Zellen wurden mit den gezeigten Vektoren transfiziert und mittels anti-Xpress-Primärantikörper die Expression des Xpress-Fähnchens untersucht.

Damit wurde gezeigt, dass in HEK293-Zellen sowohl der hMR als auch die mit EGFP oder Xpress modifizierten Formen des hMR mittels geeigneter Vektoren exprimiert werden können.

#### **4.1.2 Darstellung des hMR auf Proteinebene in OK-Zellen nach Transfektion**

Da in der vorliegenden Arbeit auch mit einer anderen renalen Zell-Linie, den OK-Zellen, gearbeitet werden sollte, wurde untersucht, ob der EGFP-hMR ebenfalls in OK-Zellen zur Expression gebracht werden kann. OK-Zellen wurden deshalb mit EGFP-hMR transfiziert und die Expression des hMR mittels Western Blot untersucht (Abb. 9). Unter Verwendung des gleichen Anti-EGFP-Antikörpers ließ sich in OK-Zellen, die nur mit Vehikellösung inkubiert wurden („OK-Wildtyp“), kein EGFP-hMR nachweisen. Nach Transfektion des EGFP-hMR konnte dieser jedoch von den Zellen exprimiert werden. Als ~ 130 kDa großes Fusionsprotein konnte auf dieser Höhe eine Bande dargestellt werden.



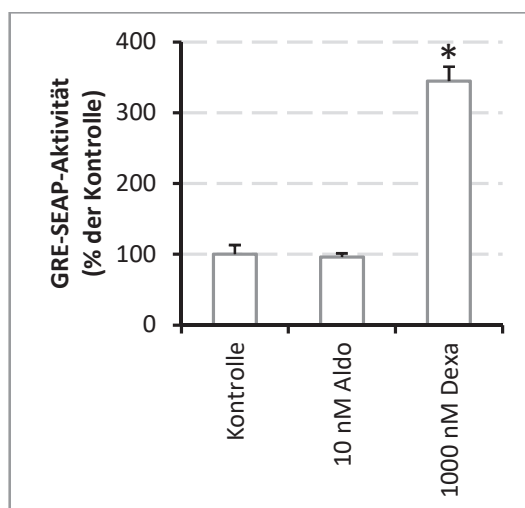
**Abb. 9:** Expression des hMR in OK-Zellen. Nach Transfektion der OK-Zellen mit einem EGFP-verknüpften hMR ließ sich das Fusionsprotein mittels anti-EGFP-Primärantikörper im Western Blot darstellen („OK-EGFP-hMR“), wohingegen in den OK-Wildtyp-Zellen ohne Transfektion kein hMR-gekoppeltes EGFP-Protein darstellbar war.

#### **4.1.3 GRE-SEAP-Aktivierbarkeit von OK-Zellen und endogene Steroidrezeptoren**

Zunächst galt es zu zeigen, dass das GRE-SEAP-Reporter-gen-System in OK-Zellen funktionell exprimiert wird und dass die OK-Zellen funktionell keinen endogenen MR exprimieren. Da sich im Laufe der anfänglichen Experimente der Zellrasen der HEK293-Zellen trotz Verwendung unterschiedlicher Passagen und trotz sorgfältiger und behutsamer Pipettiermaßnahmen häufig vom Untergrund löste, wurde bei den GRE-SEAP -Versuchen auf die OK-Zell-Linie ausgewichen. Zunächst wurde die Stimulierbarkeit eines eventuell vorhandenen endogenen MR durch die Liganden des GR bzw. des MR getestet. Die Fähigkeit der Steroidhormonrezeptoren im Repor-

tergen-Assay über das GRE-Element des GRE-SEAP-Plasmids eine vermehrte SEAP-Aktivität zu induzieren, wird im Folgenden als Transaktivierungsaktivität bezeichnet.

Wie in Abb. 10 zu sehen ist, zeigte sich im Medium der nur mit einem Kontrollplasmid und GRE-SEAP transfizierten OK-Zellen keine SEAP-Aktivität. Ebenfalls war im Medium der mit GRE-SEAP-transfizierten OK-Zellen, die mit der recht hohen Konzentration von 10 nM Aldosteron inkubiert worden waren, keine SEAP-Aktivität zu beobachten. Dagegen war eine deutliche Aktivitätszunahme durch 1000 nM Dexamethason zu beobachten. Klassischerweise gilt Aldosteron als Aktivator des MR, während Dexamethason und Hydrocortison als Aktivatoren des GR gelten (43). Bei Vorhandensein eines endogenen MR wäre bereits ohne MR-Plasmid-Transfektion, wie hier geschehen, eine GRE-SEAP-Aktivierung durch Aldosteron zu erwarten gewesen. Demzufolge wird die Annahme gestärkt, dass die OK-Zell-Linie keinen endogenen MR, aber einen endogenen GR besitzt, wie es bereits durch F. Vrtorsnik et al. (175) beschrieben wurde.



**Abb. 10:** Wirkung von Aldosteron und Dexamethason auf OK-Zellen, die mit einem Kontrollplasmid und dem GRE-SEAP-Plasmid transfiziert wurden: Nur Dexamethason führte zu einer Stimulation der SEAP-Expression, Aldosteron dagegen nicht. (n = 3; \* p < 0,05)

#### **4.1.4 GRE-SEAP-Aktivierbarkeit transfizierter OK-Zellen mit dem humanen**

##### **Mineralokortikoid- bzw. humanen Glukokortikoidrezeptor**

Im Gegensatz zur Transfektion mit einem Kontrollvektor (pcDNA3.1) war eine GRE-SEAP-Stimulierung durch Aldosteron nach Co-Transfektion der OK-Zellen mit dem hMR möglich (Abb. 11).

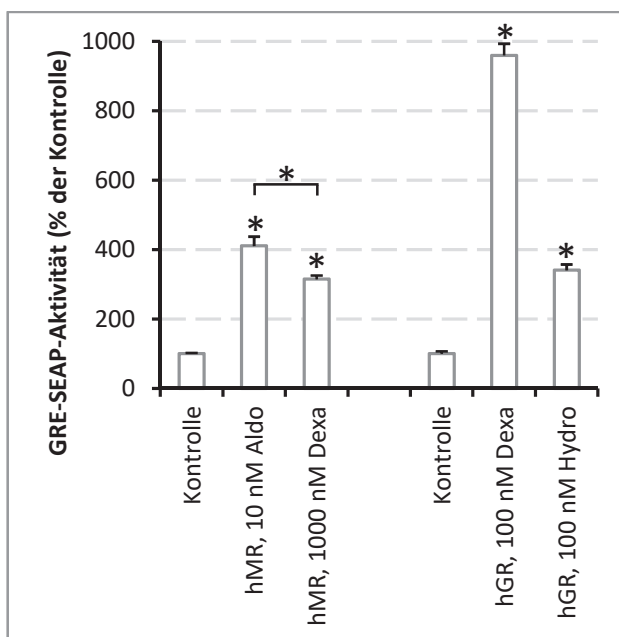
Zusätzlich war die Einschleusung und funktionelle Expression anderer Steroidrezeptoren, wie dem hGR möglich. Die darauf folgende Stimulation mit 100 nM Dexamethason bzw. 100 nM



Hydrocortison induzierte ebenfalls eine Zunahme der GRE-SEAP-Aktivität in den mit hGR transfizierten Zellen. Insbesondere Dexamethason führte zu einer massiven Induktion. Möglicher Grund dafür könnte die simultane Verfügbarkeit des transfizierten hGR zusätzlich zum endogenen GR sein.

Der hMR konnte in OK-Zellen nicht nur durch Aldosteron, sondern auch durch Dexamethason aktiviert werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass nach entsprechender Plasmidtransfektion die Steroidhormone Aldosteron, Dexamethason und Hydrocortison eine Steroidrezeptor-Aktivierung und damit Erhöhung der GRE-SEAP-Aktivität in OK-Zellen hervorrufen können.

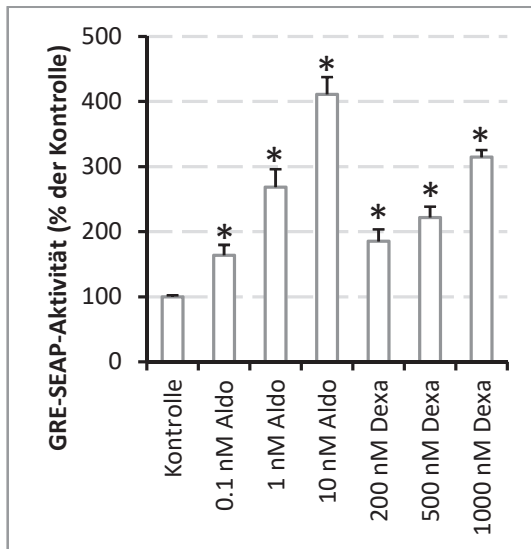


**Abb. 11:** Wirkung von Aldosteron, Dexamethason und Hydrocortison auf OK-Zellen, die entweder mit EGFP-hMR oder EGFP-hGR transfiziert wurden: Die jeweiligen Agonisten erzielten eine erhöhte GRE-SEAP-Aktivität. (n ≥ 3; \* p < 0,05)

#### **4.1.5 Dosis-Antwort-Beziehung der GRE-SEAP-Aktivierung durch Aldosteron und**

##### **Dexamethason**

Wie in Abschnitt 4.1.4 gezeigt, war eine Aktivierung des transfizierten hMR in OK-Zellen durch Aldosteron und Dexamethason möglich. Um eine dosisabhängige Wirkung der GRE-SEAP-Aktivierung in OK-Zellen zu untersuchen, welche mit hMR transfiziert wurden, wurden Aldosteron-Konzentrationen von 0.1 nM, 1 nM und 10 nM gewählt, für Dexamethason Konzentrationen von 200 nM, 500 nM (nicht abgebildet) und 1000 nM. Es zeigte sich eine klar dosisabhängige Wirkung: Je höher die Aldosteron- bzw. Dexamethason-Konzentration gewählt wurde, desto höher fiel die hMR-Transaktivierungsaktivität aus (siehe Abb. 12).



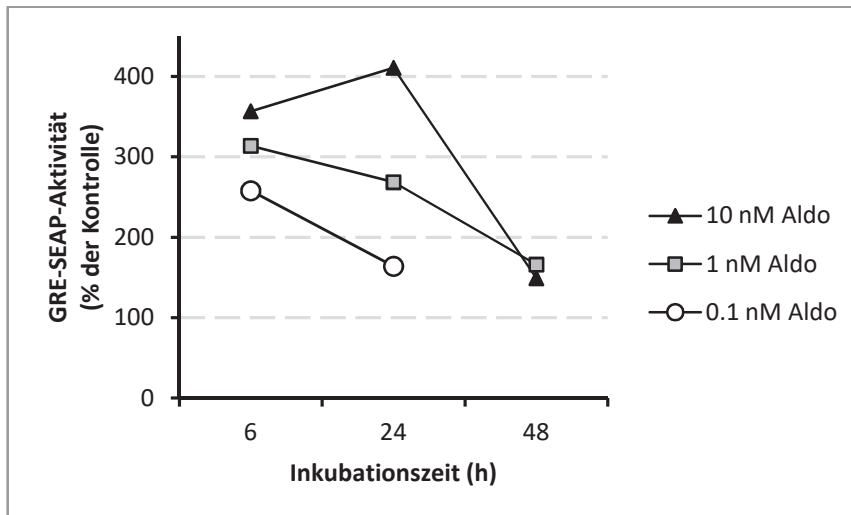
**Abb. 12:** Dosis-Wirkungs-Beziehung der GRE-SEAP-Aktivierung durch Aldosteron und Dexamethason in hMR-transfizierten OK-Zellen nach 24 Stunden Inkubationszeit: Mit steigender Hormon-Konzentration wurde eine erhöhte hMR-Transaktivierungsaktivität erreicht. (n ≥ 3; \* p < 0,05)

Ebenfalls war eine zeitliche Abhängigkeit zu erkennen: Sechs, 24 oder 48 Stunden Inkubation mit entweder 0.1 nM, 1 nM oder 10 nM Aldosteron bewirkten, dass die Stimulierbarkeit des Reporter-gen-Assays mit zunehmender Inkubationszeit abnahm (Abb. 13).

Das bedeutet, je länger Aldosteron Zeit zur Beeinflussung hatte, desto geringer ausgeprägt war dessen induzierender, dh. stimulierender Effekt. Nach 48 Stunden war zwar noch ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten, dieser war aber im Gegensatz zu den in Abb. 12 präsentierten Ergebnissen nicht mehr konzentrationsabhängig. Zudem lag der Grad der Aktivierung auch deutlich unter dem Effekt nach 6 bzw. 24 Stunden Inkubationszeit für die jeweils gewählte Aldosteron-Konzentration.

Bei der höchsten verwendeten Aldosteron-Konzentration (10 nM) war die GRE-SEAP-Aktivierung nach 24 Stunden ähnlich der nach 6 Stunden erreichten. In den folgenden Experimenten mit HEK293- und OK-Zellen wurde zumeist eine 24-stündige Inkubationsdauer eingehalten, so dass die genannten Ergebnisse, falls nicht anders angegeben, für 24 Stunden Inkubationszeit gelten.

Wichtig bei einer Wirkzeit von 24 Stunden ist auch die Überlegung, dass genotrope Effekte eine gewisse Vorlaufzeit benötigen, um die Transkriptionsmaschinerie in vollem Umfang zu rekrutieren und zu aktivieren.



**Abb. 13:** Zeitliche Abhängigkeit der GRE-SEAP-Aktivierung durch Aldosteron in unterschiedlichen Konzentrationen in transfizierten hMR-OK-Zellen: Mit zunehmender Inkubationsdauer sinkt die hMR-Transaktivierungsaktivität. (n ≥ 6)

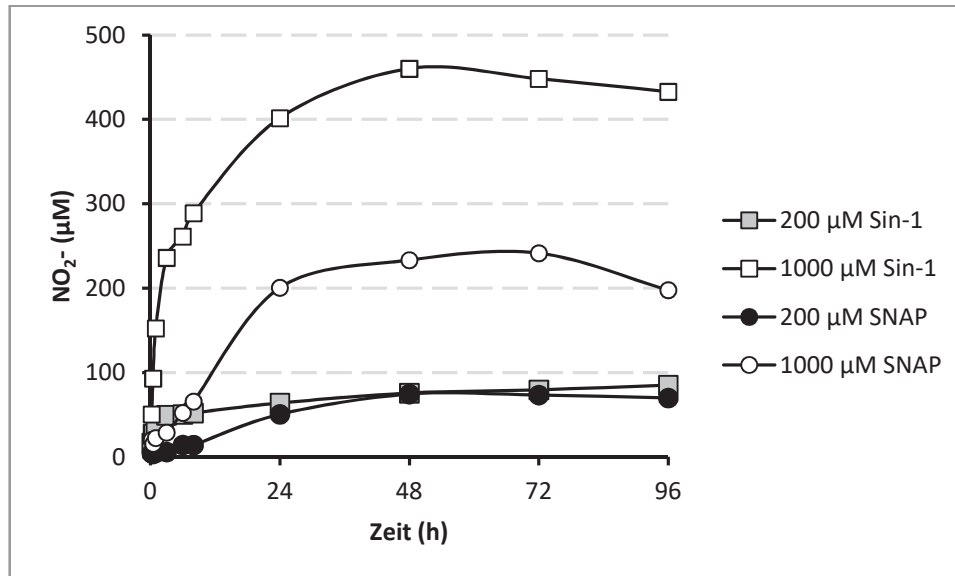
## **4.2 NO-Bildung und Peroxynitrit-Freisetzung durch Sin-1 bzw. SNAP**

### **4.2.1 NO- bzw. Nitrit-Bestimmung im Nitrit-Assay**

Da in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen des Radikal-Einflusses von Stickstoffmonoxid (NO) und seiner Abkömmlinge, insbesondere Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), auf den hMR untersucht werden sollten, war es notwendig zu erfahren, ob die Radikal-Donoren Sin-1 und SNAP eine genügende NO-Freisetzung ermöglichen. Eine direkte NO-Messung ist aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit und zahlreichen Folgereaktionen nahezu unmöglich. Als Nebenprodukt der NO-Bildung entsteht durch Autooxidation von NO mit Sauerstoff Nitrit. Nitrit kann spezifisch mit dem Griess-Reagenz nachgewiesen werden (181). Mit Hilfe dieser recht einfachen Methode kann die Nitrit- und damit indirekt die NO-Freisetzung durch die in diesen Versuchsmodellen verwendeten Radikal-Donoren Sin-1 und SNAP unter Zellkulturbedingungen bestimmt werden. In Abb. 14 ist die durch die Freisetzung von NO bedingte Zunahme von Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) dargestellt.

In Anwesenheit von Sin-1 im zellfreien Medium war eine schnelle NO-Bildung zu verzeichnen, welche unter Verwendung von 200 µM Sin-1 ein Plateau nach 6 Stunden und bei 1000 µM Sin-1 nach etwa 24 Stunden erreichte. Vergleichend dazu geschah die NO-Bildung durch SNAP weniger schnell. Eine Plateau-Phase wurde erst nach ca. 24 Stunden sowohl unter Verwendung von 200 µM als auch 1000 µM SNAP erreicht. Die maximale NO-Freisetzung durch die niedrigeren Sin-1- und SNAP-Konzentrationen (200 µM) war nahezu identisch. Dagegen wurde durch 1000 µM SNAP nur ungefähr 50 % der NO-Menge freigesetzt, wie es durch 1000 µM Sin-1 der Fall war.

Diese Beobachtungen zeigten somit, dass während der Experimente mit Zellkulturen, die einen Inkubationszeitraum von 6-48 Stunden überspannen sollten, NO in ausreichender Menge vorhanden ist, um auch neu gebildeten hMR potentiell modifizieren zu können.



**Abb. 14:** Zeit- und dosisabhängige Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ )-Bildung in Zellkulturmedium durch Sin-1 bzw. SNAP ermittelt mit Griess-Reagenz. Charakteristisch für Sin-1 war eine anfänglich schnelle NO-Freisetzung, die – wie auch durch SNAP – bald ein Plateau erreichte. Die höchste NO-Freisetzung konnte hierbei durch 1000  $\mu\text{M}$  Sin-1 erzielt werden. (Zellkulturmedium, 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ;  $n \geq 2$ )

#### **4.2.2 Bestimmung der Peroxynitrit-Bildung mit monoklonalem 3-Nitro-Tyrosin-Antikörper**

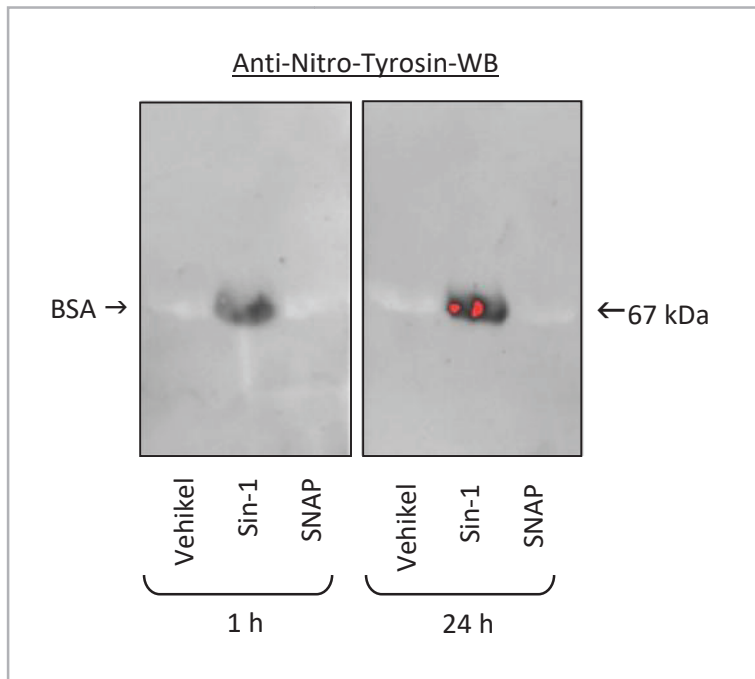
Im vorherigen Abschnitt wurde dargelegt, dass sowohl Sin-1 als auch SNAP Stickstoffmonoxid unter Zellkulturbedingungen in das zellfreie Medium freisetzen. Es ist bekannt, dass Sin-1 zudem ein Peroxynitrit-Bildner ist (184).

Um die Peroxynitrit-Bildung von Sin-1 unter Zellkulturbedingungen nachzuweisen, wurde bovines Serumalbumin (BSA) (1000  $\mu\text{M}$ ) in Zellkulturmedium (DMEM/Ham's F12) gelöst und entweder mit Vehikel, 1000  $\mu\text{M}$  Sin-1 oder 1000  $\mu\text{M}$  SNAP für je eine oder 24 Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde ein Immunoblot mit monoklonalem 3-Nitro-Tyrosin-Antikörper durchgeführt (Abb. 15). Sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden Inkubation war im Bereich der 67 kDa großen Proteine (das entspricht der Größe des BSA) nur bei Sin-1 eine Bande nachweisbar. Das heißt, nur Sin-1 war in der Lage, die Tyrosin-Reste des BSA zu nitrieren, welche dann durch den Antikörper erkannt wurden.

Zu erklären ist dies dadurch, dass durch Sin-1 nicht nur NO, sondern zusätzlich auch Superoxid-Anionen freigesetzt werden (184-186), welche spontan miteinander zu Peroxynitrit reagieren.

Dieses wiederum trägt zur Nitrierung der Tyrosin-Reste bei, welche im bovinen Serumalbumin enthalten sind.

Es lässt sich schlussfolgern, dass nur Sin-1 sowohl NO freisetzen kann als auch (indirekt) zur Bildung von  $\text{ONOO}^-$  führt, während SNAP ein reiner NO-Donor ist (siehe hierfür auch: Materialien und Methoden, Abschnitt 3.4).



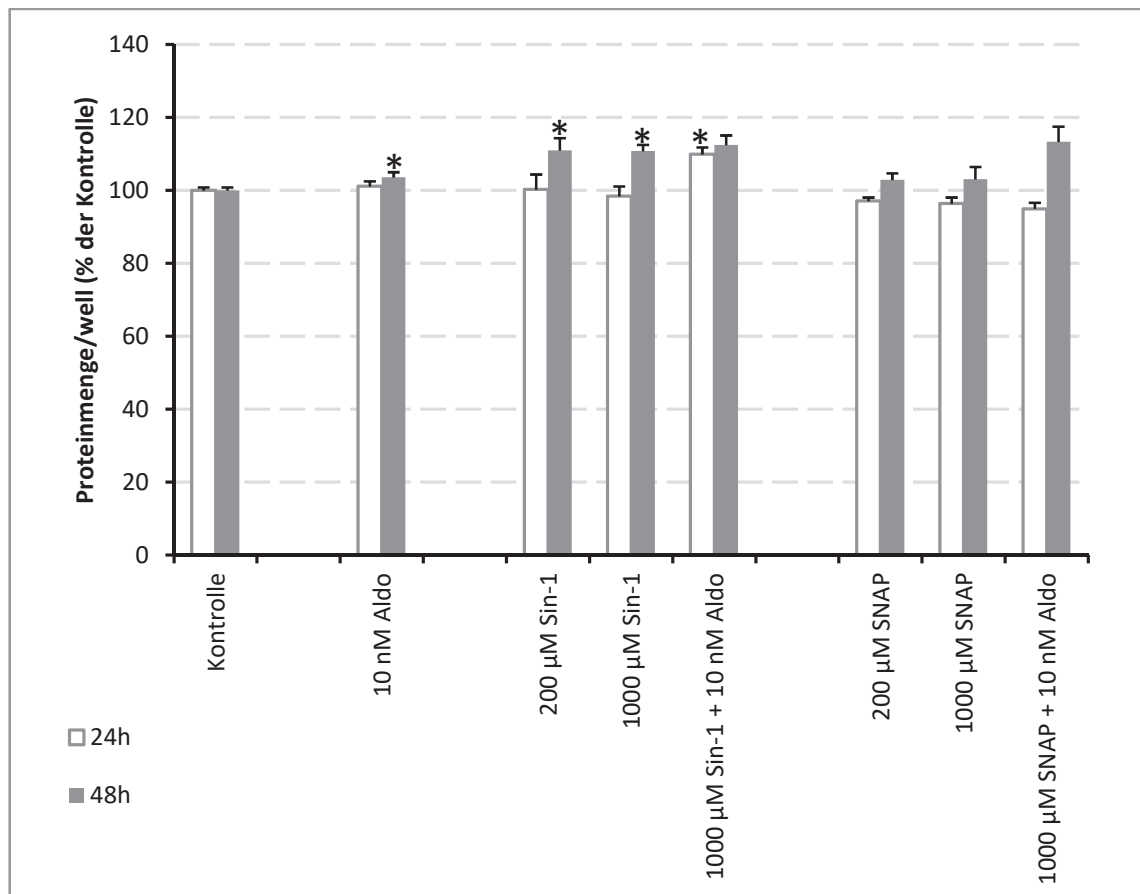
**Abb. 15:** Nachweis von nitrierten Tyrosin-Resten in bovinem Serumalbumin (BSA) mittels monoklonalem 3-Nitro-Tyrosin-Antikörper aus der Maus (Santa Cruz Biotechnology) nach BSA-Inkubation mit Sin-1 bzw. SNAP.

#### **4.2.3 Beeinflussung der Proteinmenge durch Zugabe der beiden Radikal-Donoren Sin-1 bzw. SNAP**

Um eine eventuelle zytotoxische Wirkung der Reagenzien Sin-1 und SNAP abzuschätzen, wurde in den OK-Zell-Lysaten der GRE-SEAP-Reporter-Gen-Assays die Proteinmenge bestimmt, was als ein ungefähres Maß für die Zytotoxizität angenommen wurde.

In Abb. 16 sind die Proteinmengen je well als Prozent der Kontrolle für Sin-1 und SNAP (je 200 bzw. 1000  $\mu\text{M}$ ) dargestellt. Zusätzlich wurde die Auswirkung auf die Proteinmenge nach Zugabe von 10 nM Aldosteron untersucht. Es ist zu erkennen, dass bei höherer Konzentration keiner der beiden Radikal-Donoren auch nach 48-stündiger Inkubation zu einer Reduktion der Proteinmenge führte. Dies zeigt, dass die Substanzen zumindest nicht derart zytotoxisch auf OK-Zellen wirkten, als dass sich die (eventuell abgestorbenen) Zellen vom Untergrund vermehrt abgehoben hätten und dadurch bei einem Waschvorgang verloren gegangen wären.

Auch wenn zusätzlich simultan mit Aldosteron inkubiert wurde, war kein Verlust der Proteinmenge zu erkennen.



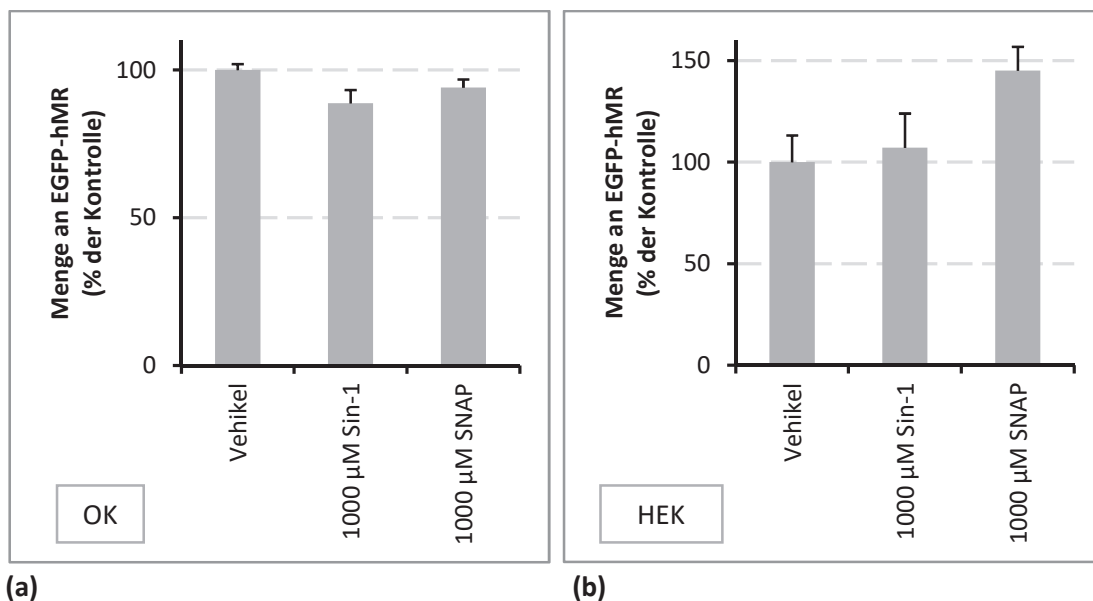
**Abb. 16:** Zeit- und konzentrationsabhängiger Einfluss von Aldosteron, Sin-1, SNAP allein bzw. bei gleichzeitiger Inkubation auf die Proteinmenge von OK-Zellen: OK-Zellen wurden entweder mit 10 nM Aldosteron, Sin-1 oder SNAP in zwei verschiedenen Konzentrationen für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Die Substanzzugabe bewirkte keinen Verlust an Gesamtprotein. Demnach wirkten insbesondere Sin-1 und SNAP in den verwendeten Konzentrationen nicht zytotoxisch. ( $n \geq 6$ ; \*  $p < 0,05$ )

#### **4.2.4 Quantitative Beeinflussung des humanen Mineralokortikoidrezeptors durch**

##### **Anwesenheit von Sin-1 und SNAP**

Da ein Einfluss des NO auf die Menge des hMR untersucht werden sollte, wurden zunächst Direkt-ELISA gegen das an hMR-gekoppelte EGFP in OK- bzw. HEK293-Zell-Lysaten durchgeführt. Es zeigte sich, dass weder 1000 µM Sin-1 noch 1000 µM SNAP einen signifikanten Einfluss auf den Abbau, die De-novo-Synthese oder Expression des EGFP-hMRs hatten (Abb. 17 (a) und (b)). Demzufolge kann eine Beeinflussung der MR-Aktivität durch NO-basierten Radikalstress durch vermehrtes oder vermindertes Vorhandensein des hMR ausgeschlossen werden

und die durch Sin-1 bzw. SNAP erzeugten NO-Wirkungen beruhen auf der Funktionalität des hMR.

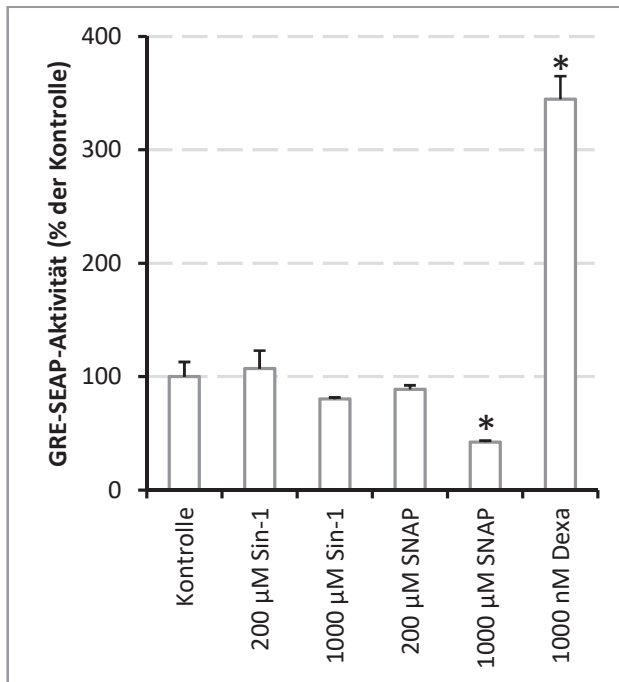


**Abb. 17:** Einfluss des NO-basierten Radikalstresses auf die Menge des EGFP-hMR. **(a)** OK- oder **(b)** HEK293-Zellen wurden 24 Stunden mit 1000 µM Sin-1 oder 1000 µM SNAP inkubiert und die Menge des EGFP-hMR durch ELISA bestimmt. (n ≥ 5; \* p < 0,05)

### **4.3 Wirkung von Sin-1 und SNAP auf die GRE-SEAP-Aktivität**

#### **4.3.1 Einfluss der Radikal-Donoren Sin-1 und SNAP auf nicht-hMR-transfizierte OK-Zellen**

In den Abschnitten 4.2.1 und 4.2.2 wurde gezeigt, dass Sin-1 auch als Peroxynitrit-Donor gilt, während SNAP nur NO freisetzt. Um den Einfluss dieser Substanzen auf die grundlegende GRE-SEAP-Aktivierbarkeit zu untersuchen, wurden OK-Zellen neben dem GRE-SEAP-Plasmid ausschließlich mit einem Kontrollplasmid (pcDNA3.1) transfiziert und mit entweder 200 µM oder 1000 µM Sin-1 bzw. SNAP inkubiert. In Abb. 18 ist zu sehen, dass sowohl Sin-1 als auch SNAP in niedriger Konzentration (200 µM) keinen Einfluss auf die GRE-SEAP-Grundaktivität in OK-Zellen hatten, welche nur mit Kontrollplasmid transfiziert wurden, wohingegen Dexamethason als bekannter Ligand des (hier endogenen) GR zu einer deutlichen Zunahme führte. Wurden die Radikal-Donoren allerdings in einer höheren Konzentration hinzugegeben (1000 µM), war eine Reduktion der Grundaktivität zu verzeichnen. Im Falle von 1000 µM SNAP war diese im Vergleich zur Kontrolle sogar signifikant. Ohne Anwesenheit eines transfizierten Kortikoid-Rezeptors kann dieser Effekt auf eine unspezifische Wirkung des SNAP auf das Reportergen zurückgeführt werden. Möglicherweise basiert dieser Effekt aber auch auf einer Inhibition des endogenen GR, welcher sicherlich auch im nicht-aktivierten Zustand eine gewisse Grundaktivität aufweist und damit potentiell beeinflussbar wäre.



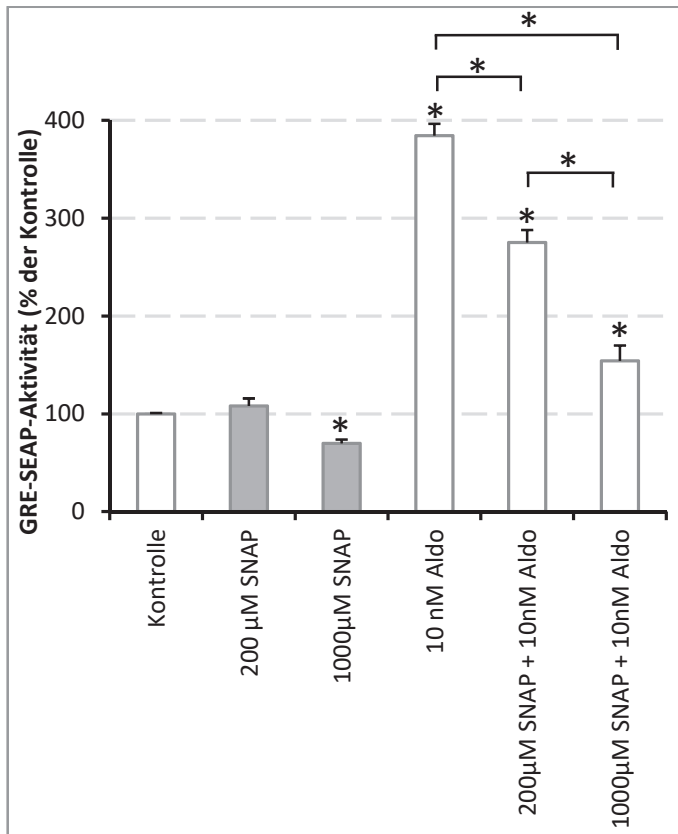
**Abb. 18:** Konzentrationsabhängiger Einfluss des Peroxynitrit-Donors Sin-1 bzw. des NO-Donors SNAP auf die GRE-SEAP-Grundaktivität in OK-Zellen, die nur mit Kontrollplasmid transfiziert wurden: In Abwesenheit eines transfizierten Kortikoid-Rezeptors ist eine tendenzielle, z.T. signifikante Reduktion der GRE-SEAP-Grundaktivität zu verzeichnen. Positivkontrolle: 1000 nM Dexamethason. ( $n \geq 3$ ; \*  $p < 0,05$ )

#### **4.3.2 Einfluss von SNAP auf die hMR-Transaktivierungsaktivität in OK-Zellen**

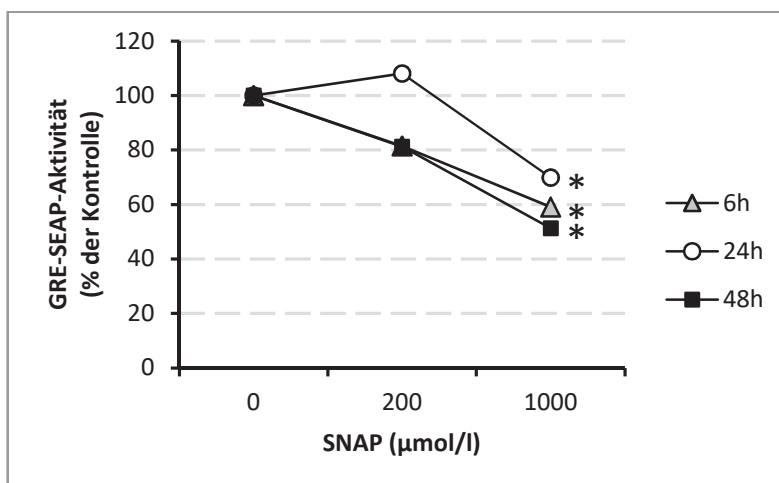
Im vorherigen Abschnitt konnte beschrieben werden, dass durch die alleinige Anwesenheit von 200 µM SNAP weder eine Aktivierung noch eine Inhibierung des GRE-SEAP-Systems zu erzielen war. Dies trifft auch auf OK-Zellen zu, die anstatt eines Kontrollplasmids mit EGFP-hMR transfiziert wurden (Abb. 19, graue Balken).

Dagegen war eine (signifikante) Inhibierung der basalen hMR-Aktivität (ohne Aldosteron-Stimulation) bei einer höheren SNAP-Konzentration von 1000 µM zu beobachten (Abb. 19, graue Balken). Diese Inhibierung war nach 48 Stunden deutlicher ausgeprägt als nach 24 Stunden (Abb. 20).





**Abb. 19:** Konzentrationsabhängiger Einfluss von SNAP auf die hMR-Transaktivierungsaktivität in transfizierten OK-Zellen mit und ohne Aldosteron-Einfluss: SNAP reduzierte in Anwesenheit des hMR sowohl die GRE-SEAP-Grundaktivität als auch die Aldosteron-vermittelte GRE-SEAP-Stimulation. (n ≥ 24; \* p < 0,05)

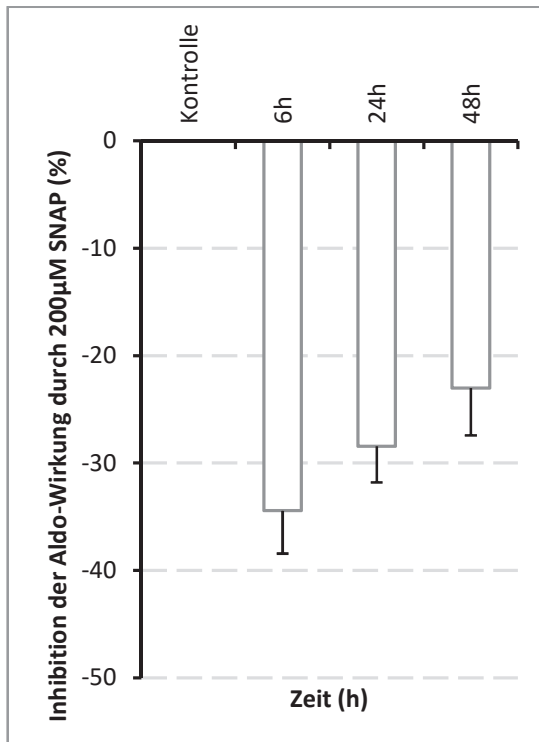


**Abb. 20:** SNAP-induzierte Beeinflussung der hMR-Aktivität (ohne Aldosteronstimulation) in OK-Zellen in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration: Je höher die SNAP-Konzentration gewählt wurde, desto geringer fiel die GRE-SEAP-Aktivität aus. (n ≥ 9; \* p < 0,05)

Dagegen induzierte die Gabe von 10 nM Aldosteron eine ca. 4-fache Zunahme der GRE-SEAP-Aktivität in EGFP-hMR-transfizierten OK-Zellen. Das heißt, es war eine Zunahme der hMR-Transaktivierungsaktivität durch Aldosteron zu beobachten. Bei gleichzeitiger Inkubation mit Aldosteron und dem NO-Donor SNAP war eine Abnahme der durch Aldosteron allein erzielten Wirkung zu sehen (Abb. 19, weiße Balken). Demzufolge hat die simultane Gabe von SNAP zu Aldosteron einen inhibierenden Effekt auf die eigentlich stimulierend wirkende Aldosteron-induzierte hMR-Transaktivierungsaktivität.

Diese Beeinflussung der Aldosteron-vermittelten hMR-Aktivität durch SNAP war abhängig von der SNAP-Konzentration. Die Hemmung der Aldosteron-Wirkung in hMR-transfizierten OK-Zellen war umso stärker, je höher die SNAP-Konzentration gewählt wurde. Dieser deutliche Effekt lässt sich nicht ausschließlich durch die inhibitorische Eigenwirkung von SNAP auf den hMR und das Reporter-gen erklären, sondern scheint zusätzlich eine Beeinflussung der Aldosteron-verursachten Aktivitätszunahme zu sein.

Desweiteren wurde der Einfluss von SNAP (in einer Konzentration von 200  $\mu$ M) auf die Aldosteron-stimulierte hMR-Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer betrachtet (Abb. 21). Nach 6, 24 oder 48 Stunden Inkubation mit 200  $\mu$ M SNAP zeigte sich eine zeitabhängige Reduktion der Aldosteron-verursachten hMR-Transaktivierungsaktivität. Im Mittel war eine Senkung der Aktivität um 30 % zu erkennen. Allerdings war ein Rückgang des inhibierenden Effektes mit zunehmender Inkubationsdauer zu beobachten.



**Abb. 21:** Zeitabhängige SNAP-verursachte Abnahme der Aldosteron-Wirkung auf die GRE-SEAP-Aktivität in mit hMR und GRE-SEAP transfizierten OK-Zellen: Eine Konzentration von 200 µM SNAP bewirkte eine Reduktion der mit 10 nM Aldosteron maximal erreichbaren hMR-Transaktivierungsaktivität. Dieser Effekt schwächte sich mit zunehmender Inkubationsdauer ab.

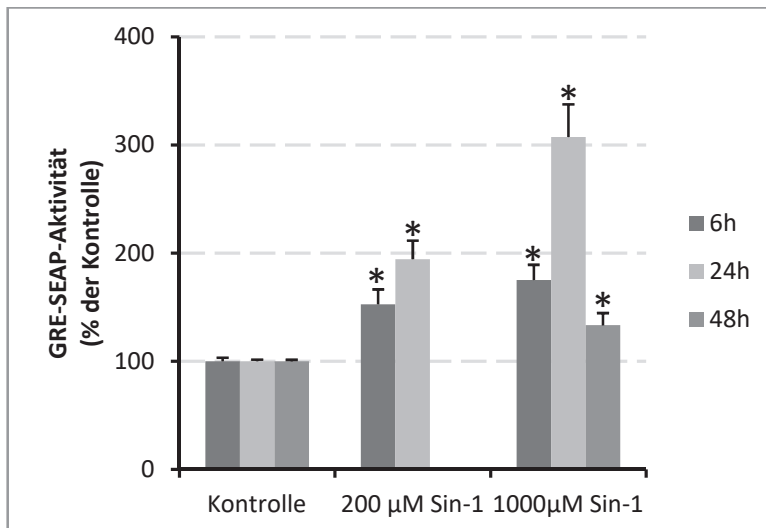
#### **4.3.3 Einfluss von Sin-1 auf die hMR-Transaktivierungsaktivität in OK-Zellen**

Die Beeinflussung der GRE-SEAP-Aktivität durch den NO-Donor SNAP mit und ohne Aldosteronzugabe wurde in den vorangehenden Abschnitten untersucht. Unter ähnlichen Bedingungen wurde nun auch die Wirkung des Peroxynitrit-Bildners Sin-1 betrachtet.

In Abb. 22 ist die Fähigkeit von Sin-1 zur Beeinflussung hMR-transfizierter OK-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (6, 24 und 48 Stunden) und Konzentration (200 µM und 1000 µM) abgebildet. Zunächst wurde die Sin-1-Eigenwirkung, also ohne den Einfluss von Aldosteron auf das hMR-Reportergen-Konstrukt betrachtet.

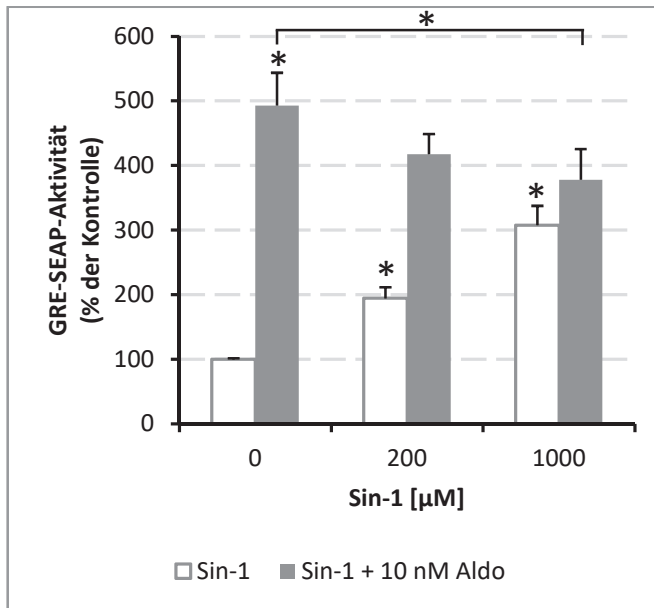
Es zeigte sich, dass bereits Sin-1 allein, das heißt ohne Aldosteronzugabe, die GRE-SEAP-Aktivität erhöhte. Dieser stimulierende Effekt konnte für beide gewählte Konzentrationen erzielt werden und traf ebenso für alle Inkubationszeiten zu. Am stärksten war der konzentrations- und zeitabhängige Effekt nach 24 Stunden Inkubation zu erkennen. Dahingegen nahm – betrachtet für 1000 µM Sin-1 - die Fähigkeit zur Stimulation nach 48 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden ab. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die NO-Freisetzung aus Sin-1 (wie in Abschnitt 4.2.1 gezeigt) erst nach 24 Stunden annähernd ein Plateau erreichte, so dass nach 24 im Vergleich zu 6 Stunden eine vermehrte Radikalverfügbarkeit zur Aktivitätszunahme beitrug,

während die Aktivitätsabnahme nach 48 im Vergleich zu 24 Stunden bedingt sein könnte durch nun verstärkt wirkende Radikal-Schutzmaßnahmen innerhalb der Zelle. Diese könnten dazu führen, dass durch Sin-1 hervorgerufene Veränderungen rückgängig gemacht werden und das System nun weniger empfindlich auf die Sin-1-bedingte Beeinflussung reagierte.



**Abb. 22:** Konzentrations- und zeitabhängige Darstellung der hMR-Transaktivierungsaktivität in OK-Zellen durch den Peroxynitrit-Bildner Sin-1: Auch ohne Hormonstimulation hatte Sin-1 schon eine stimulierende Eigenwirkung. Dieser Eigeneffekt war nach 24 Stunden Inkubationsdauer am stärksten ausgeprägt. Bei einer Konzentration von 1000 µM fiel nach 48 Stunden Inkubation die stimulierende Eigenwirkung fast auf Kontroll-Niveau ab. (n ≥ 6; \* p < 0,05)

Hierauf wurde die Beeinflussung der Aldosteron-induzierten hMR-Aktivierung durch Sin-1 untersucht. In Abb. 23 ist dazu die konzentrationsabhängige Wirkung von Sin-1 in An- oder Abwesenheit von 10 nM Aldosteron dargestellt. Sowohl durch Aldosteron allein als auch durch die simultane Inkubation mit entweder 200 µM oder 1000 µM Sin-1 war eine vermehrte GRE-SEAP-Aktivität zu messen. Während jedoch schon 1000 µM Sin-1 allein eine stimulierende Wirkung auf das GRE-SEAP-System, genauer gesagt, den hMR besaß, war dieser Effekt zusammen mit Aldosteron nicht zu erkennen. Die konzentrationsabhängige Induktionsfähigkeit ging also in Aldosteron-Anwesenheit verloren. Anders betrachtet, reduzierte 1000 µM Sin-1 die durch Aldosteron allein hervorgerufene Aktivierungsfähigkeit.

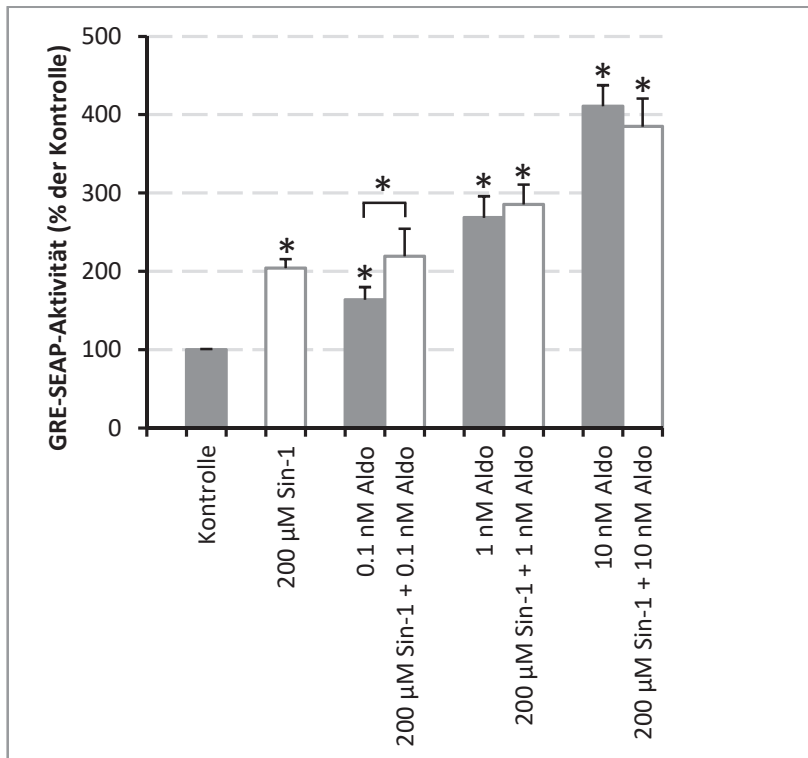


**Abb. 23:** Konzentrationsabhängiger Einfluss von Sin-1 auf den nicht stimulierten oder durch Aldosteron stimulierten hMR in transfizierten OK-Zellen: Sin-1 ohne Aldosteron bewirkte eine gesteigerte hMR-Transaktivierungsaktivität (weiße Balken). Dagegen bewirkte 1000 µM Sin-1 eine Abnahme der durch Aldosteron hervorgerufenen Stimulierbarkeit des hMR. (n ≥ 9; \* p < 0,05)

Aus den in Abschnitt 4.3.1 gezeigten Ergebnissen geht hervor, dass mit Sin-1 inkubierte OK-Zellen ohne zusätzliche Steroidrezeptor-Transfektion keinen signifikanten Unterschied der GRE-SEAP-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Dies verdeutlicht, dass die eben gezeigten Effekte, also sowohl die stimulierende Sin-1-Eigenwirkung der GRE-SEAP-Aktivität in Anwesenheit des hMR als auch die Reduktion der Aldosteron-bedingten hMR-Aktivierung durch Sin-1, eine Beeinflussung des hMR selbst darstellen musste, da weder eine Beeinflussung des endogenen GR noch des GRE-SEAP-Reportergens bestand.

Um den Einfluss von Aldosteron auf die GRE-SEAP-Aktivierbarkeit bei gleichbleibender Sin-1-Konzentration zu untersuchen, wurden OK-Zellen für 24 Stunden mit 200 µM Sin-1 und unterschiedlichen Aldosteron-Konzentrationen (0.1 nM, 1 nM und 10 nM) inkubiert (Abb. 24).

Es zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der GRE-SEAP-Aktivität. Diese war ähnlich wie die in Abschnitt 4.1.5 gezeigte dosisabhängige hMR-Aktivierung durch Aldosteron allein. Demnach war der Einfluss von Aldosteron auf den hMR unabhängig davon, ob ein durch 200 µM Sin-1 verursachter nitrosativer Stress vorlag oder nicht, wohingegen durch höhere Sin-1-Konzentrationen (1000 µM) der Einfluss von Aldosteron gehemmt wurde.



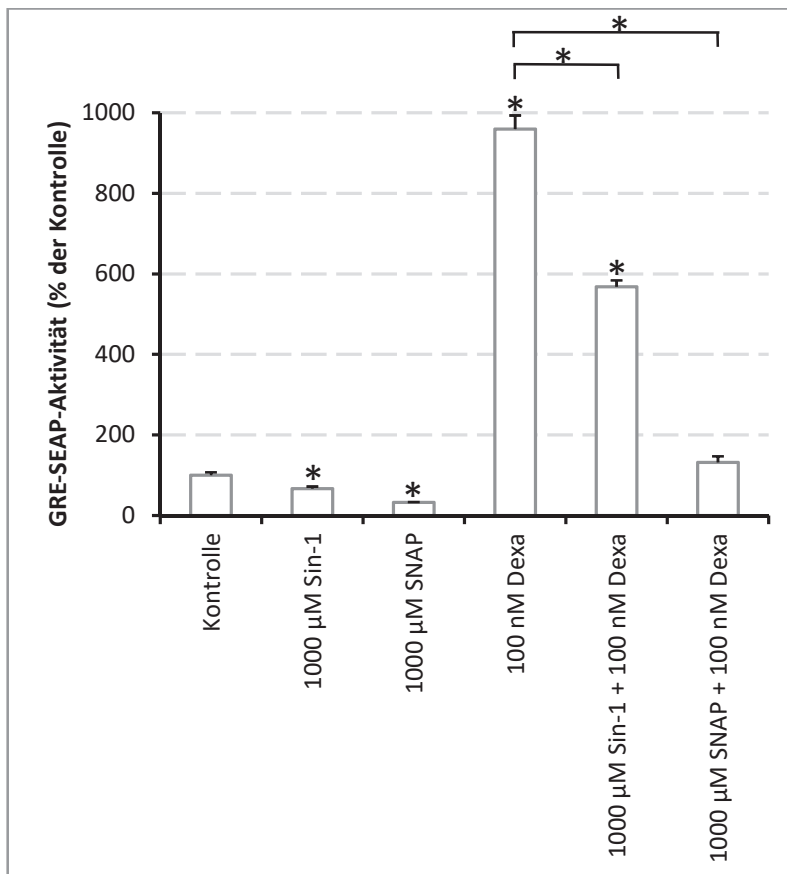
**Abb. 24:** Konzentrationsabhängiger Einfluss von Aldosteron auf die GRE-SEAP-Aktivität in mit hMR transfizierten OK-Zellen bei gleichbleibender Sin-1-Konzentration: Dosisabhängig war eine steigende GRE-SEAP-Aktivität zu verzeichnen, die jedoch durch 200 µM Sin-1 nicht signifikant beeinflusst wurde. ( $n \geq 6$ ; \*  $p < 0,05$ )

#### **4.3.4 Einfluss von Sin-1 und SNAP sowie Dexamethason auf den hGR in OK-Zellen**

In Abschnitt 4.1.4 wurde bereits der hGR als ein weiterer Steroidhormonrezeptor gezeigt, welcher in OK-Zellen transfiziert werden kann. Er wird durch das synthetische fluorierte Glukokortikoid Dexamethason stimuliert, welches in vivo keine relevante mineralokortikoide Wirkung besitzt, sondern fast ausschließlich ein GR-Agonist ist.

Um die Frage zu klären, ob die bisher beschriebenen Wirkungen der Radikal-Donoren auf den hMR auch für den hGR gelten, wurden OK-Zellen anstatt mit dem hMR mit dem hGR transfiziert und so durch eine Überexpression eine Stimulation mit 100 nM Dexamethason induziert. Die alleinige Gabe von 1000 µM Sin-1 zu mit hGR transfizierten OK-Zellen führte zu einer signifikanten Abnahme der GRE-SEAP-Aktivität. Im Gegensatz zur stimulierenden Wirkung auf den hMR hatte Sin-1 eine inhibierende Wirkung auf den hGR. Dexamethason (100 nM) führte zu einer deutlichen Zunahme der GRE-SEAP-Aktivität in mit hGR transfizierten Zellen, die durch die zusätzliche Gabe von 1000 µM Sin-1 verringert wurde (Abb. 25).

Der NO-Donor SNAP hatte ähnlich wie Sin-1 eine Reduktion der GRE-SEAP-Aktivität zur Folge (Abb. 25). Die durch Dexamethason hervorgerufene Zunahme der Aktivität konnte durch SNAP fast auf Kontroll-Niveau herabgesetzt werden.



**Abb. 25:** Einfluss von Dexamethason, Sin-1 und SNAP auf OK-Zellen, die mit dem hGR transfiziert wurden: Sowohl Sin-1 als auch SNAP hatten eine inhibierende Wirkung auf die hGR-Grundaktivität im GRE-SEAP-Versuchsmodell. Die stimulierende Hormonwirkung durch Dexamethason auf die GRE-SEAP-Aktivität wurde durch die Gabe von jeweils 1000 µM Sin-1 bzw. SNAP abgeschwächt. (n = 3; \* p < 0,05)

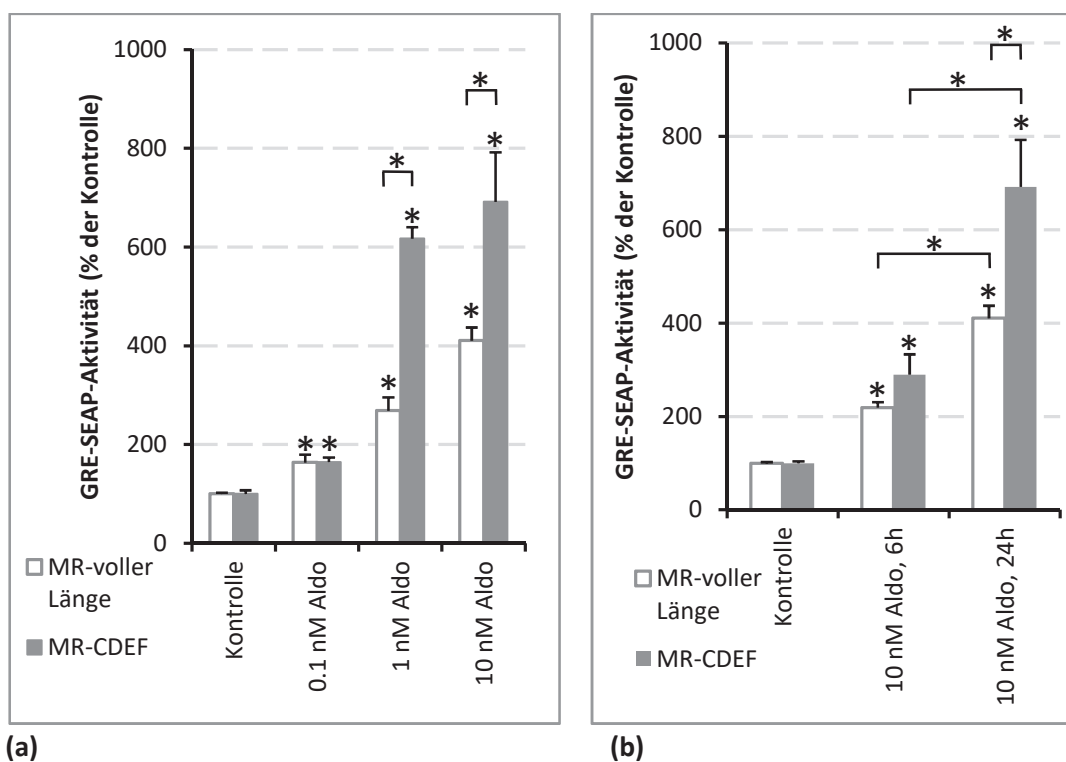
Demnach war die SNAP-Eigenwirkung nach Transfektion der OK-Zellen mit hGR vergleichbar mit den Ergebnissen nach Transfektion mit hMR. Die beiden Radikal-Donoren Sin-1 und SNAP waren in der Lage, die GRE-SEAP-Aktivität des Hormon-stimulierten Steroidrezeptors zu reduzieren, wobei dieser Effekt insbesondere unter Verwendung von 1000 µM SNAP stark ausgeprägt war und dabei beim hGR die am stärksten inhibierende Wirkung erzielt wurde.

#### **4.3.5 Domänen-abhängige Beeinflussung der hMR-Transaktivierungsaktivität in OK-Zellen**

Um zu analysieren, welche Abschnitte des hMR an der durch Aldosteron bzw. Sin-1 beeinflussten Transaktivierungsaktivität beteiligt sind, standen trunkierte Varianten des hMR zur Verfügung. Die trunkierte Version MR-CDEF beinhaltet beispielsweise im Vergleich zum hMR voller Länge keine N-terminale A/B-Domäne. Die A/B-Domäne besitzt eine ligandenunabhängige

Region mit intrinsischer inhibitorischer Funktion, so dass die trunkierte hMR-Variante CDEF nicht mehr dem Einfluss dieser Regionen unterliegt und somit Aldosteron den hMR stärker stimulieren könnte (45).

Durch Aldosteron ließen sich in OK-Zellen sowohl der ungekürzte hMR als auch die gekürzte Variante hMR-CDEF aktivieren (Abb. 26). Dabei fiel auf, dass sich der hMR-CDEF sehr viel stärker aktivieren ließ als die ungekürzte Variante, was zeigt, dass im hMR mit der vollen Länge innerhalb der A/B-Region tatsächlich inhibitorische Abschnitte enthalten sind (187), welche beim hMR-CDEF fehlen. Dieser Effekt war sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig zu beobachten (Abb. 26 (a) und (b)).



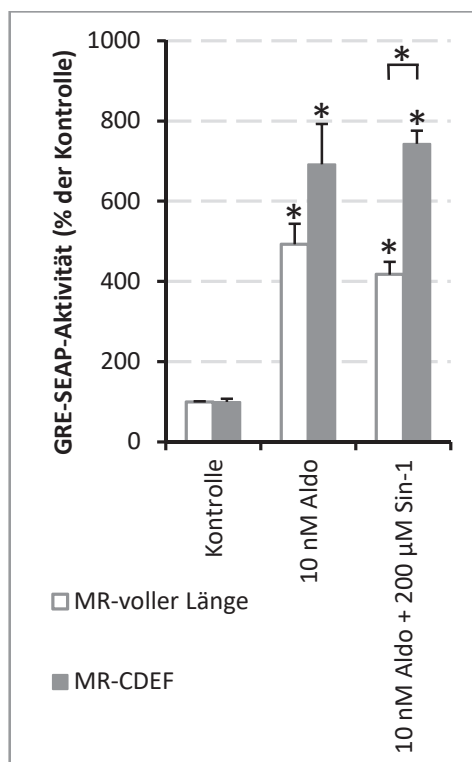
**Abb. 26:** (a) Konzentrations- und (b) zeitabhängige Wirkung von Aldosteron auf die GRE-SEAP-Aktivierung in OK-Zellen, die entweder mit dem hMR voller Länge oder einer gekürzten („trunkierten“) Variante (hMR-CDEF) transfiziert wurden: Sowohl die trunkierte hMR-CDEF-Variante als auch die Variante voller Länge ließ sich konzentrations- und zeitabhängig durch Aldosteron stimulieren. ( $n \geq 3$ ; \*  $p < 0,05$ )

Für den hMR voller Länge wurde in Abschnitt 4.3.3, Abb. 23 beschrieben, dass die simultane Inkubation von mit hMR-transfizierten OK-Zellen mit 10 nM Aldosteron und 200  $\mu$ M Sin-1 zwar eine Stimulation des GRE-SEAP-Modells hervorrief, die auf eine Aktivierung des hMR zurückzuführen war, diese Stimulation war aber nicht so stark wie die durch 10 nM Aldosteron allein erzielte. Wurden nun unter den selben Bedingungen hMR-CDEF-transfizierte OK-Zellen inkubiert, zeigte sich, dass zwischen Stimulation mit Aldosteron allein bzw. Aldosteron + Sin-1



kein signifikanter Unterschied hervorgerufen wurde (Abb. 27). Das zeigt, dass Sin-1 die inhibierende Wirkung der N-terminalen A/B-Domäne des hMR verstärkt, wenn dieser durch Aldosteron stimuliert wird.

Wird für hMR-CDEF-transfizierte OK-Zellen also postuliert, dass der Simultaneffekt von Aldosteron + Sin-1 A/B-Domänen-abhängig ist, wäre eine mögliche Erklärung, dass Sin-1 Veränderungen bewirkt, die die konformationelle Änderung des Rezeptors nach Ligandenbindung beeinflusst.



**Abb. 27:** Sin-1-abhängige Wirkung von Aldosteron auf OK-Zellen, die entweder mit dem hMR voller Länge oder der trunkierten Variante hMR-CDEF transfiziert wurden: Die Abnahme der stimulierenden Wirkung in OK-Zellen, welche mit dem hMR voller Länge transfiziert wurden und die durch Zugabe von Sin-1 zu Aldosteron hervorgerufen wird, kann unter Verwendung der trunkierten hMR-CDEF-Version nicht beobachtet werden. ( $n \geq 3$ ; \*  $p < 0,05$ )

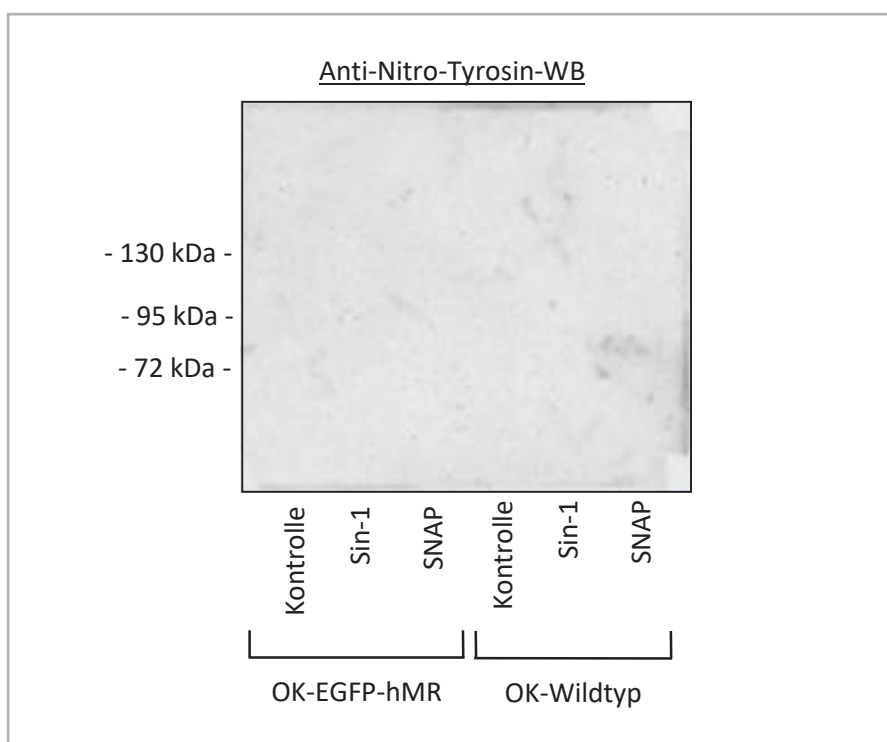
#### **4.4 Protein-Tyrosin-Nitrierung**

##### **4.4.1 Protein-Tyrosin-Nitrierung in OK-Zellen**

Als mögliche Ursache einer veränderten hMR-Aktivität werden posttranslationale Protein-Modifikationen, welche durch Radikaleinfluss entstehen, diskutiert. Dazu zählen z.B. die S-Nitrosylierung, Carbonylierung und die Protein-Tyrosin-Nitrierung, die auch in dieser Arbeit durch Sin-1 an BSA hervorgerufen werden konnte (Abschnitt 4.2.2). Sin-1 setzt die Radikale NO und  $O_2^-$  frei, welche nach Bildung von  $ONOO^-$  in der Lage sind, die in den Proteinen enthalte-

nen Tyrosin-Reste zu nitrieren. Da das hMR-Protein ebenso Tyrosin-Reste enthält, bestand die Überlegung, dass nach Inkubation der hMR-transfizierten OK-Zellen mit NO-Radikal-Donoren eine Nitrierung auftreten könnte.

Um dies zu überprüfen, wurden mit EGFP-hMR transfizierte OK-Zellen mit 1000  $\mu$ M Sin-1 bzw. SNAP für entweder 1 oder 24 Stunden inkubiert. Nach dieser Behandlung konnte sowohl nach einer als auch nach 24 Stunden im Western Blot keinerlei nitriertes Protein nachgewiesen werden (Abb. 28). Zu erwarten gewesen wäre zumindest eine der Länge nach verwischte Bande wenigstens nach Inkubation mit Sin-1, da im Modell der BSA-Nitrierung eine Nitrierungsfähigkeit prinzipiell nachgewiesen werden konnte.



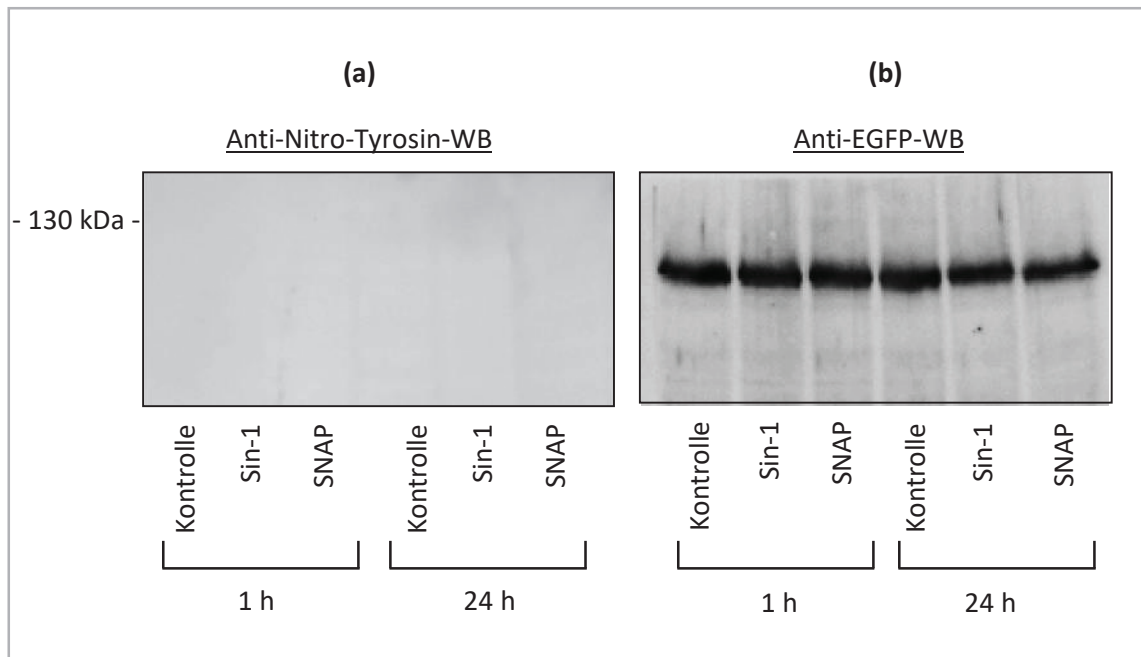
**Abb. 28:** Nachweis von Nitro-Tyrosin nach 24-stündiger Inkubation mit Sin-1 oder SNAP in OK-Zellen, welche entweder nicht oder mit EGFP-hMR transfiziert wurden (repräsentativer Blot). In diesem repräsentativen Western Blot konnte keinerlei nitriertes Tyrosin nachgewiesen werden.

#### 4.4.2 Protein-Tyrosin-Nitrierung in HEK293-Zellen

Die Inkubation von Zellen mit den Radikal-Donoren Sin-1 bzw. SNAP wurde anstatt mit OK-Zellen wie unter 3.4.1 aufgeführt mit HEK293-Zellen wiederholt. Es sollte getestet werden, ob eine Nitrierung intrazellulärer Proteine durch Radikal-Donoren bei einer Zell-Linie einer anderen Spezies möglich ist. Hierfür wurden die HEK293-Zellen wiederum mit dem EGFP-hMR transfiziert. Es erfolgte weiterhin die anschließende Inkubation mit 1000  $\mu$ M Sin-1 oder 1000  $\mu$ M SNAP für 24 Stunden. Darauf folgte die Western Blot-Analyse mit dem anti-Nitro-Tyrosin-

Antikörper (Abb. 29 (a)). Es waren auch bei den HEK293-Zellen keinerlei Banden zu erkennen, die auf eine Nitrierung hätten schließen lassen.

Um sicherzugehen, dass die HEK293-Zellen mit EGFP-hMR transfiziert waren, wurden die Lysate aus den selben Zellen in einem weiteren Western Blot-Versuch gegen EGFP getestet. In Abb. 29 (b) erkennt man deutlich, dass in allen Proben der EGFP-hMR exprimiert wurde, der, falls er nitriert worden wäre, ein Signal hätte geben müssen.

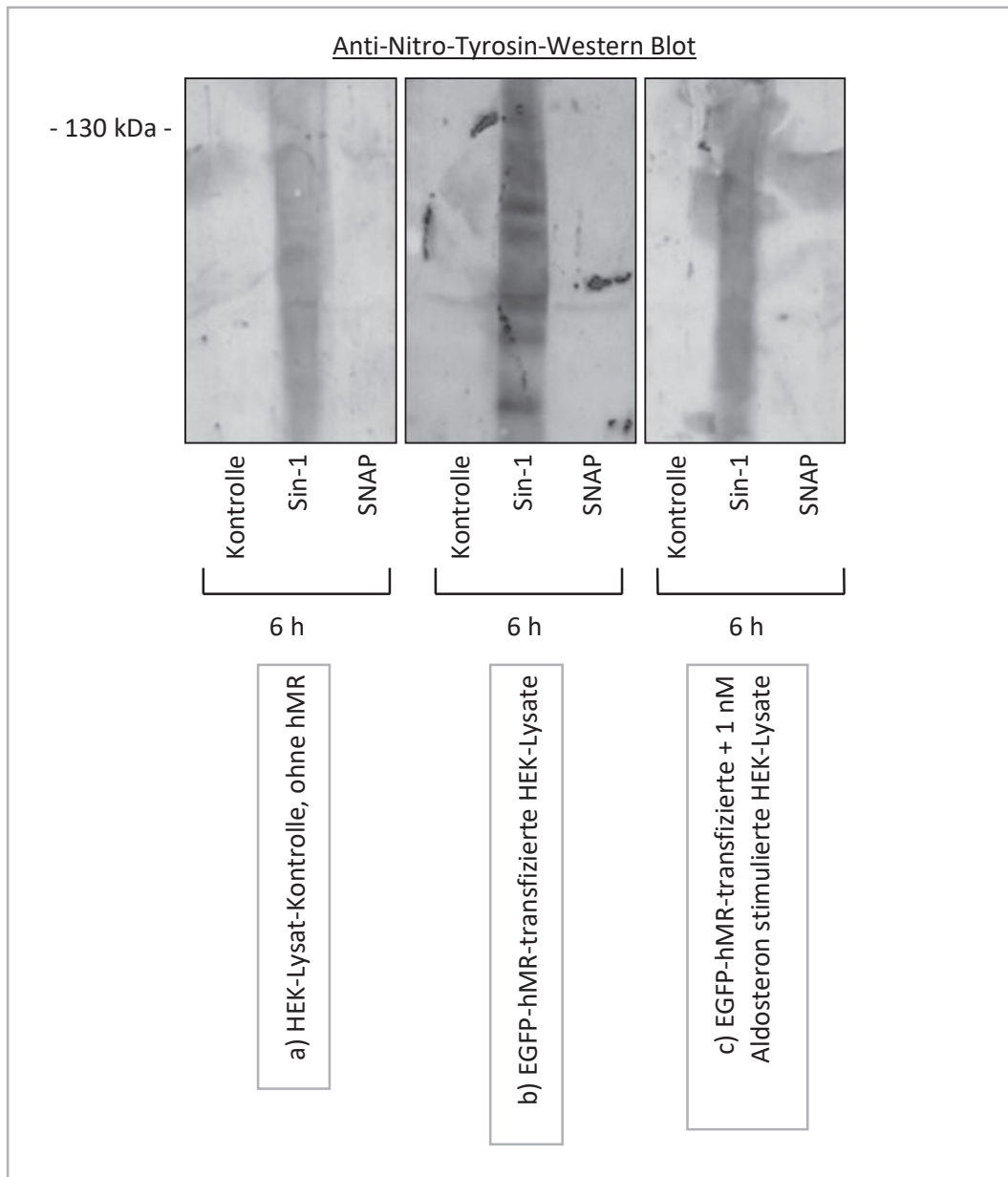


**Abb. 29:** (a) Nachweis von Nitro-Tyrosin. Mit EGFP-hMR transfizierte HEK293-Zellen wurden eine bzw. 24 Stunden mit Vehikel, Sin-1 oder SNAP inkubiert. Danach wurden in den Lysaten Nitro-Tyrosin-Reste mittels Western Blot detektiert. Repräsentativer Blot von drei Versuchen. (b) Nachweis der Expression des EGFP-Fähnchens in den selben Zell-Lysaten, das an den hMR gekoppelt war, welcher in die HEK293-Zellen transfiziert wurde.

#### 4.4.3 Protein-Tyrosin-Nitrierung in Zell-Lysaten mittels Sin-1 bzw. SNAP

Anstatt die intakten HEK293-Zellen mit den Radikal-Donoren zu inkubieren, wurden deren Zell-Lysate mit 1000  $\mu$ M Sin-1 bzw. 1000  $\mu$ M SNAP inkubiert. Es wurden Lysate aus HEK293-Zellen verwendet, die a) nicht mit hMR transfiziert wurden oder b) mit EGFP-hMR transfiziert wurden oder c) zunächst mit EGFP-hMR transfiziert und anschließend mit 1 nM Aldosteron stimuliert wurden. Unter Verwendung des Anti-Nitro-Tyrosin-Erstantikörpers im Western Blot (Abb. 30) war bei allen drei Ansätzen ausschließlich bei den mit Sin-1 inkubierten Zell-Lysaten ein über die gesamte Länge verwischtes Signal zu erkennen. Diese verwischte Bande nach Inkubation mit Sin-1 weist darauf hin, dass nicht nur einige wenige Proteine nitriert werden können, sondern eine Vielzahl, da sie Tyrosin-Reste enthalten. Durch die Lysierung scheinen eventuell vor-

handene Protektionsmechanismen der Zelle aufgehoben zu sein, die bei intakten Zellen noch aktiv waren. Damit kann gezeigt werden, dass die Proteine zumindest in den Zell-Lysaten prinzipiell durch Sin-1 nitriert werden können. SNAP, das NO freisetzt, hatte keine Nitrierung der Proteine zur Folge.



**Abb. 30:** Protein-Nitrierung in HEK293-Zell-Lysaten. HEK293-Zellen wurden zuerst lysiert, bevor sie für 6 Stunden mit 1000  $\mu$ M Sin-1 oder 1000  $\mu$ M SNAP inkubiert wurden: Es ließ sich mittels Western Blot unabhängig von der Transfektion mit EGFP-hMR und/oder Aldosteron-Stimulation eine durch Sin-1 hervorgerufene unspezifische Bande nitrierter Proteine nachweisen.

## 5. Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die führende Todesursache dar. 2012 starben laut WHO weltweit geschätzt 17,5 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, was 31 % der globalen Sterbefälle entspricht. Dabei entfallen allein 7,4 Millionen Todesfälle auf die koronare Herzkrankheit (188). Zahlreiche klinische Studien, darunter insbesondere die RALES-, EPHEBUS- und 4E-Studie, konnten die Beteiligung von Aldosteron und dem aktivierten Mineralokortikoidrezeptor an der Entstehung kardiovaskulärer sowie renaler Erkrankungen nachweisen (6;7;140). Abseits seiner klassischen Wirkungen auf den Elektrolyt- und Volumenhaushalt scheint der aktivierte MR jedoch nicht allein in der Lage zu sein, Veränderungen wie z.B. endotheliale Dysfunktion, Fibrosierung und lokale Inflammationsreaktionen zu induzieren (5;138). Bekannt ist, dass ein gewisses Umgebungsmilieu notwendig zu sein scheint, welches zur pathophysiologischen MR-Aktivierung führt. Hierfür wurde der Begriff „Koinzidenz-Modell“ geprägt (5). Es gibt Hinweise darauf, dass Änderungen des Redox-Status bzw. eine veränderte Radikal-Bildung, in Form von reaktiven Stickstoff- und Sauerstoff-Spezies (RNS bzw. ROS), daran beteiligt sind (35;129).

Die Gründe, die diese pathologische MR-Aktivierung mit verursachen, sind Gegenstand vieler aktueller Studien. In der vorliegenden Arbeit sollen mögliche Ursachen und Mechanismen einer pathologischen MR-Aktivierung durch nitrosativen Stress näher beleuchtet werden.

### **5.1 Der nitrosative Stress im experimentellen Modell**

Nitrosativer Stress in OK- oder HEK293-Zellen wurde in den Experimenten mittels SNAP und Sin-1 hervorgerufen. Während SNAP ein reiner NO-Donor ist, setzt Sin-1 sowohl NO als auch  $O_2^-$  frei, welche wiederum  $ONOO^-$  bilden.

Die Anwesenheit dieser Radikal-Donoren hatte keinen relevanten Einfluss auf die Proteinmenge der Zellen. Demnach kam es durch deren Zugabe nicht zu einem Absterben der Zellen (4.2.3), was einen zytotoxischen Effekt in den gewählten Sin-1- und SNAP-Konzentrationen ausschließt. Ebenso ließ sich kein Einfluss auf die hMR-Menge nachweisen. Das bedeutet, die durchzuführenden Versuche wurden nicht durch quantitative Schwankungen des hMR beeinflusst (4.2.4).

### **5.2 Der Umgang mit unterschiedlichen Zell-Linien: OK bzw. HEK293**

Ursprünglich sollten die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche mit HEK293-Zellen als Vertreter einer humanen Zell-Linie durchgeführt werden. In den anfänglichen GRE-SEAP-Reporter-Gen-Versuchen stellte sich jedoch bald heraus, dass das Arbeiten mit den HEK293-Zellen

schwierig war. Sie hafteten nur ungenügend an der Kulturfläche an, so dass sie während der notwendigen Waschschriffe in nennenswertem Umfang fortgespült worden sind. Aus diesem Grund wurde für die Reporter-gen-Assays auf die OK-Zell-Linie, dh. Nierenzellen aus dem proximalen Tubulus des Opossums, ausgewichen. Andere Versuchsreihen, wie Western Blot und ELISA, wurden, wenn möglich, sowohl mit OK-Zellen als auch mit HEK293-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass EGFP als Transfektionskontrolle die bessere Wahl bei HEK293-Zellen darstellte, während für OK-Zellen LacZ besser geeignet war.

Mittels Western Blot konnte am Beispiel des EGFP-hMR auch für die OK-Zellen gezeigt werden, dass Plasmide erfolgreich in die Zellen eingeschleust werden konnten und eine Expression der artfremden Proteine erfolgte. Jedoch war die Proteinbande in Höhe des EGFP-hMR-Proteins schwächer ausgebildet als es bei den HEK293-Zellen der Fall war, was darauf schließen lässt, dass in den OK-Zellen weniger EGFP-hMR exprimiert wurde.

In den GRE-SEAP-Reporter-gen-Assays zeigte nach Transfektion der OK-Zellen mit dem EGFP-hMR die alleinige Inkubation mit Aldosteron als Positivkontrolle die Funktionalität des Versuchssystems an: Aldosteron steigerte die Transaktivierungsaktivität des hMR. Somit ließen sich mit EGFP-hMR transfizierte OK-Zellen mittels Aldosteron effektiv stimulieren. Im Vergleich zu den HEK293-Zellen waren die OK-Zellen allerdings geringer stimulierbar. Wahrscheinlich befand sich in den OK-Zellen quantitativ weniger hMR, was durch die schwächere Proteinbande im Western Blot erkennbar war. Eine Transfektionskontrolle in den Reporter-gen-Assays (bei den OK-Zellen das LacZ-Plasmid) gibt eben nur an, wie gut dieses Kontroll-Plasmid, nicht jedoch wie gut das EGFP-hMR-Plasmid in die Zelle geschleust werden konnte.

### **5.3 Einfluss von NO auf die transkriptionelle hMR-Aktivität**

NO, welches aus Endothelzellen als Antwort auf chemische oder physikalische Stimuli freigesetzt wird, führt zu Vasodilatation, vermindertem Gefäßwiderstand mit erhöhtem regionalem Blutfluss, einem reduzierten systemischen Blutdruck und Thromboseschutz durch verminderte Neigung zur Plättchenaggregation. Zudem inhibiert es die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur und reduziert die Leukozyten-Adhäsion und -Migration, wodurch inflammatorische Prozesse inhibiert werden (168). NO wirkt demnach als vasoprotektive Substanz (60).

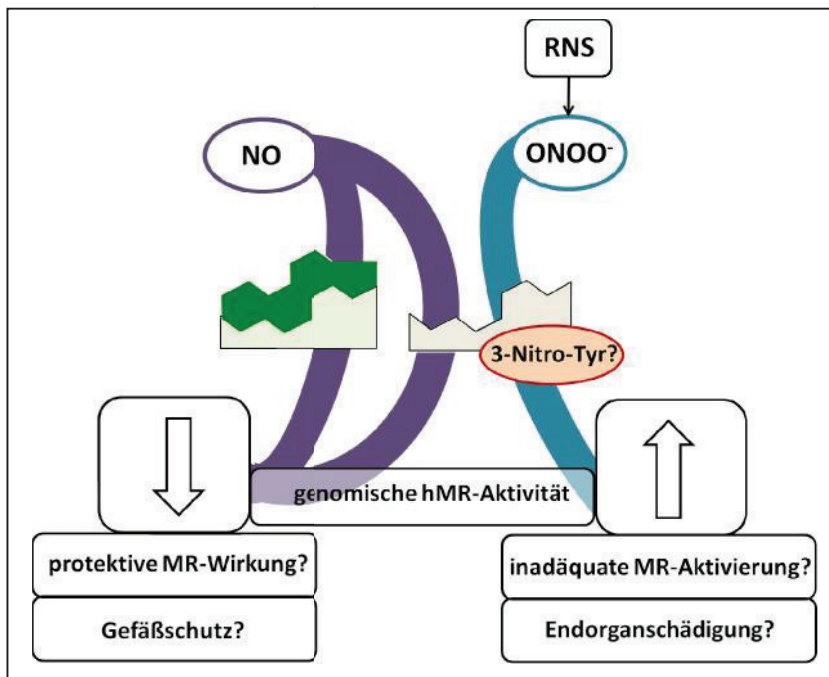
Bislang ist die Wirkung, die Stickstoffmonoxid und dessen Abkömmlinge auf den MR hat, weitestgehend unerforscht. Lediglich Ruhs et al. wiesen eine durch nitrosativen Stress hervorgerufene Beeinflussung der genomischen Kortikosteroidrezeptorfunktion nach (59).

In der vorliegenden Arbeit bewirkte der NO-Donor SNAP in niedriger Konzentration (200 µM) keine Änderung der hMR-Aktivität. Der hMR schien demnach unter einem geringeren NO-Einfluss weder inhibiert noch stimuliert zu werden. Dagegen war in Anwesenheit hoher NO-

Konzentrationen (entsprechend 1000  $\mu\text{M}$  SNAP) eine verringerte hMR-Aktivität zu beobachten. Hierbei könnte es sich um einen unspezifischen Einfluss der hohen NO-Konzentration auf die Grundaktivität des Reporter-gen-Assays gehandelt haben und war möglicherweise gar kein Effekt auf den Liganden-freien hMR. Eine besonders starke Inhibition durch NO konnte jedoch bei dem von Aldosteron aktivierten hMR beobachtet werden. Dies lässt sich nicht nur durch eine unspezifische Einwirkung auf die Reporter-gen-Grundaktivität erklären. Die Inhibition war umso ausgeprägter, je höher die SNAP-Konzentration gewählt wurde. Die Hemmung des Aldosteron-stimulierten hMR durch NO wurde auch von Ruhs et al. beobachtet, die ähnliche Versuchsreihen mit dem NO-Donor SNAP sowie dem ONOO<sup>-</sup> - Donor Sin-1 an HEK293-Zellen durchführten (59). Denkbar wäre, dass NO im Rahmen seiner vasoprotektiven Eigenschaften eine „beruhigende“ Wirkung auf den aktivierten hMR ausübt, so dass die pathologische Aktivierung verhindert wird. Die durch NO gehemmte Aldosteron-induzierte MR-Aktivität könnte ein Ansatz zur Erklärung sein, warum gerade unter krankhaften Vorbedingungen mit endothelialer Dysfunktion (z.B. kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Zigarettenrauchen) bzw. bei geschädigten Gefäßen (z.B. bei Herzinsuffizienz, Arteriosklerose, postinfarziell) eine vermehrte und pathologische MR-Aktivierung beobachtet wird (3;151). Denn diese Voraussetzungen bedingen eine verminderte NO-Verfügbarkeit, womit die gefäßschützende NO-Wirkung verloren geht: Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen NO- und ROS-Bildung in der Gefäßwand zugunsten des oxidativen Stresses durch eine eNOS-Entkopplung und einer gesteigerten NAD(P)H-Oxidase-Aktivität (148;189). Zeitgleich wird ein Circulus vitiosus geschaffen: Aldosteron führt zu einer Versteifung der vaskulären Endothelzellschicht, weshalb durch Scherstress weniger NO freigesetzt werden kann und so zu endothelialer Dysfunktion beiträgt (168). Zusätzlich wird Aldosteron-induziert vermehrt NAD(P)H-Oxidase-abhängig ROS produziert, welches vorhandenes NO weg-fängt (168).

Die RALES-Studie hat gezeigt, dass die Inhibition des MR mit Spironolakton zu einer 30%igen Reduktion der Mortalität bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt führt (7). Eine Rolle scheint hierbei die NO-Verfügbarkeit zu spielen, denn die Gabe von Eplerenon (ebenfalls ein MR-Antagonist mit jedoch selektiverer Wirkung) verbesserte im Tiermodell mit Kaninchen nach myokardialer Ischämie die NO-Bioverfügbarkeit und es verbesserte die endotheliale Dysfunktion durch verminderten oxidativen Stress (148;170).

Dies unterstützt die Annahme, dass sich die Anwesenheit von NO protektiv auf eine pathologische MR-Aktivierung auswirkt, wie es in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (Abb. 31).



**Abb. 31:** Schematische Übersicht der Einflüsse von Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit auf die genomische (transkriptionelle) hMR-Aktivität im GRE-SEAP-Reportergen-Assay in OK-Zellen mit bzw. ohne Aldosteron-Stimulation und mögliche Konsequenzen.

((h)MR: (humaner) Mineralokortikoidrezeptor, NO: Stickstoffmonoxid, ONOO<sup>-</sup>: Peroxynitrit, RNS: reaktive Stickstoffspezies)

#### **5.4 Einfluss von Peroxynitrit auf die transkriptionelle hMR-Aktivität**

Bei der Klärung der Frage, wie der MR in einem gewissen Umgebungsmilieu trotz oftmals normaler oder sogar erniedrigter Aldosteron-Plasma-Konzentration aktiviert wird, stößt man unweigerlich stets auf die Anwesenheit von ROS und RNS. Dabei scheint die Bildung oxidativer Spezies (z.B. durch die NADPH-Oxidase) nicht nur die Folge einer unangebrachten MR-Aktivierung zu sein (14;170). Es häufen sich Studien, die nahelegen, dass eine erhöhte Menge an ROS in der Lage zu sein scheint, den MR Liganden-unabhängig zu aktivieren (4). Peroxynitrit steht stellvertretend für sowohl oxidativen als auch nitrosativen Stress, wie er in der Gefäßwand durch endotheliale Dysfunktion und Inflammationsprozesse entsteht (148). In den während dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit OK-Zell-Kulturen bewirkte der Peroxynitrit-Donor Sin-1 eine Stimulation der Aktivität des freien, also Aldosteron-ungebundenen hMR, welche nach 24 Stunden und bei einer hohen ONOO<sup>-</sup>-Konzentration (entsprechend 1000  $\mu$ M Sin-1) am stärksten ausgeprägt war (Abb. 31). Dies war auf eine hMR-Beeinflussung zurückzuführen, da Sin-1 die Grundaktivität des GRE-SEAP-Reportergen-Assays in Abwesenheit des hMR nicht beeinträchtigte.

Ruhs et al. beobachteten eine Aktivitätszunahme des Liganden-ungebundenen MR sowie eine Translokation des Liganden-ungebundenen MR in den Zellkern von HEK293-Zellen durch den



ONOO<sup>-</sup>-Donor Sin-1 (59). Nagase et al. konnten für embryonale Ratten-Kardiomyozyten ebenfalls zeigen, dass oxidativer Stress zu einer Aktivitätssteigerung und zu einer vermehrten Translokation in den Zellkern sowohl des freien als auch des mit Hormon-gebundenen MR führte. Die Autoren fanden heraus, dass hierbei als Vermittler Rac1 beteiligt ist, eine kleine GTPase der Rho-Familie, die Bestandteil der NADPH-Oxidase ist (190). In in vitro-Studien mit Mause Aortas konnten Newfell et al. einige Gene identifizieren, die nur in Anwesenheit freier Sauerstoffradikale durch Aldosteron-Einfluss stimuliert wurden (172). Auch im Tiermodell mit Angiotensin II-induziert hypertensiven Ratten konnte bereits gezeigt werden, dass eine MR-Aktivierung durch oxidativen Stress zu linksventrikulärer diastolischer Dysfunktion führt (191). Zahlreiche Studien haben bislang beschrieben, dass der vermehrte Anfall von ROS und RNS eine Folge einer verstärkten Aldosteron-Einwirkung bzw. Folge einer MR-Aktivierung darstellt (14;136). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten jedoch zusätzlich zu den oben beschriebenen Ergebnissen anderer Autoren an, dass nitrosativer Stress ebenso eine *Ursache* einer vermehrten MR-Aktivierung sein kann. Denkbar ist, dass daraus eine Art Teufelskreis entsteht, der zu einer anhaltenden pathogenen MR-Aktivierung führt.

Peroxynitrit führte wie NO in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zu einer Reduktion der Aktivität des Aldosteron-stimulierten hMR in OK-Zellen. Jedoch bewirkte ONOO<sup>-</sup> dies erst bei erhöhten Sin-1-Konzentrationen (1000 µM). Ein ähnliches Ergebnis konnte mit HEK293-Zellen ebenfalls im GRE-SEAP-Reporter-Gen-Assay von Ruhs et al. beobachtet werden (59). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Sin-1 bei pathologisch hohen Aldosteron-Konzentrationen (10 nM) möglicherweise als partieller Antagonist agiert. Hingegen erzielten Nagase et al. eine signifikant gesteigerte Aktivität des Hormon-gebundenen MR durch oxidativen Stress mit embryonalen Ratten-Kardiomyozyten (190), was zeigt, dass die Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen ROS/RNS und dem MR deutlich komplexer zu sein scheint. Diese uneinheitlichen Ergebnisse lassen Freiraum für weiterführende Untersuchungen.

### **5.5 Einfluss von NO und Peroxynitrit auf die transkriptionelle hGR-Aktivität**

Obwohl der hGR der engste Verwandte des hMR ist (62), sind die in dieser Arbeit bisher gezeigten Ergebnisse nicht automatisch auf diesen Steroidhormonrezeptor übertragbar. In den durchgeführten Experimenten mit OK-Zellen konnte so wie beim Hormon-freien hMR die hGR-Aktivität in Anwesenheit von hohen NO-Konzentrationen (entsprechend 1000 µM SNAP) gehemmt werden. NO scheint ähnlich wie beim hMR eine „beruhigende“ Wirkung auf den hGR auszuüben. Hingegen führten, anders als beim Liganden-freien hMR, hohe ONOO<sup>-</sup>-Konzentrationen (entsprechend 1000 µM Sin-1) zu einer reduzierten Aktivität des Liganden-freien, dh.

unstimulierten hGR. Qualitativ vergleichbar mit dem Aldosteron-stimulierten hMR riefen sowohl ONOO<sup>-</sup> als auch NO in erhöhten Konzentrationen (je 1000 µM Radikal-Donor) eine verminderte Aktivität des durch Dexamethason stimulierten hGR hervor. Der nitrosative Stress durch NO und Peroxynitrit führte demnach bei beiden Liganden-stimulierten Steroidhormonrezeptoren zu einer inhibierenden Wirkung.

Möglicherweise beruht dieser Effekt auf die hGR-Aktivität auf einer Beeinflussung der Translokation in den Zellkern. Okamoto et al. konnten zeigen, dass unter oxidativen Stressbedingungen die Translokation des Liganden-gebundenen GR in den Zellkern verhindert wurde, so dass in Reporter-gen-Versuchen unter oxidativem Stress eine reduzierte GR-Aktivität beobachtet wurde (192).

Allgemein wird den Glukokortikoiden eine anti-inflammatorische und anti-angiogene Wirkung zugeschrieben (193). Denkbar wäre auch, dass die Unterdrückung der zellulären Glukokortikoid-Wirkung während inflammatorischer Prozesse von physiologischer Bedeutung ist oder dass sie unter krankhaften Bedingungen zur Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion beiträgt.

Es gibt mittlerweile die Erkenntnis, dass Glukokortikoide unter gewissen Voraussetzungen, wie einem Glukokortikoid-Exzess (z.B. beim Cushing-Syndrom) oder beim Auftreten kardiovaskulärer Risikofaktoren Inflammations- und Atherosklerose-fördernde Wirkung besitzen können (193). Dafür spricht auch, dass die 11-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1, welche die Plasma-Glukokortikoide zu aktiven Metaboliten katalysiert, in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert und durch pro-inflammatorische Zytokine stimuliert wird (193). Die in dieser Arbeit gezeigte Inhibierung des GR durch NO und ONOO<sup>-</sup> könnte möglicherweise als vasoprotektive Reaktion auf den nitrosativen und oxidativen Stresszustand zur Aufhebung der antiangiogenen Wirkung beitragen.

### **5.6 Einfluss von Peroxynitrit auf die A/B-Domäne des hMR**

Wie in Abschnitt 4.3 und 4.4 beschrieben, war die Aktivität des hMR-voller Länge durch nitrosativen Stress beeinflussbar. Da der hMR aus verschiedenen Domänen besteht, stellte sich die Frage, welche dieser Domänen für die aufgezeigten Effekte verantwortlich sein könnten. Aus diesem Grund wurden mögliche Wirkorte des nitrosativen Stresses am hMR untersucht. Einer trunkierten Variante des MR, dem MR-CDEF, fehlt die N-terminale A/B-Domäne, welche eine Liganden-unabhängige Region mit intrinsischer inhibitorischer Funktion besitzt, so dass diese hMR-Variante nicht mehr dem Einfluss dieser Regionen unterliegt und somit Aldosteron den hMR stärker stimulieren könnte (45). Zudem ist die N-terminale Domäne eine Angriffsregion für diverse Koregulatoren.

Während der Versuche bewirkte ONOO<sup>-</sup> eine gesteigerte Aktivität des durch Aldosteron stimulierten trunkierten hMR-CDEF im Reporter-Gen-Assay, während die Aktivität des vollständigen hMR, der mit Aldosteron stimuliert wurde, durch ONOO<sup>-</sup> gehemmt wurde. Demnach könnte die A/B-Domäne des (Aldosteron-stimulierten) hMR potenzieller Wirkort von ONOO<sup>-</sup> sein. Möglicherweise stimuliert ONOO<sup>-</sup> die inhibierende A/B-Domäne in ihrer Aktivität, wenn der hMR (voller Länge) durch Aldosteron stimuliert wird. Dies könnte beispielsweise durch konformationelle Änderungen des Steroidrezeptors nach Ligandenbindung geschehen oder durch eine veränderte Bindung von Koaktivatoren bzw. Korepressoren. Zur veränderten Bindung von Koregulatoren an den hMR in Bezug auf diesen Sachverhalt ist jedoch noch nichts bekannt.

### **5.7 Die Tyrosin-Nitrierung: Der Fußabdruck durch nitrosativen Stress**

Die transkriptionelle Aktivität nukleärer Rezeptoren inklusive des MR kann auf vielfältige Weise beeinflusst werden: z.B. über die exprimierte Menge des MR, Beeinflussung der Translokation in den Zellkern, epigenetische Modifikationen, Rekrutierung von Koregulatoren und Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (190). Posttranslationale Modifikationen sind eine weitere Möglichkeit, die Funktion von Proteinen wie des MR zu beeinflussen. Als solche Modifikationen wurden für den hMR bislang u.a. die Phosphorylierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung und Acetylierung beschrieben (22;190). Bekannt ist desweiteren, dass unter Einwirkung von Peroxynitrit bzw. RNS die Nitrierung von Tyrosin-Resten zur Bildung von 3-Nitro-Tyrosin als posttranslationale Proteinmodifikation führt und demnach einen „Fußabdruck“ des nitrosativen Stresses hinterlässt (161;163).

Eine Frage der vorliegenden Arbeit war, ob es eine Tyrosin-Nitrierung des hMR-Proteins gibt, was zu strukturellen und somit auch möglichen funktionellen Beeinträchtigungen führen könnte. Zunächst wurden die Radikal-Donoren Sin-1 und SNAP mit Rinder-Albumin (BSA) inkubiert. Wie zu erwarten war, führte lediglich das Sin-1, welches zur Anwesenheit von ONOO<sup>-</sup> führt, zur Nitrierung der Tyrosin-Reste im BSA. Mit SNAP, entsprechend NO, war keine Tyrosin-Nitrierung zu erzielen. Im nächsten Schritt wurden intakte, dh. nicht lysierte OK-Zellen bzw. intakte HEK293-Zellen mit den Radikal-Donoren inkubiert. Überraschenderweise konnte keinerlei nitriertes Protein mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Nach Lysierung der (selben) HEK293-Zellen, dh. nach Zerstörung der Zellmembran, war jedoch die Nitrierung vieler Tyrosin-haltiger Proteine als eine der Länge nach verwischte Bande im Western Blot nachweisbar.

Trotz Variation der experimentellen Bedingungen gelang es nicht, die Nitrierung des hMR oder anderer Proteine in intakten HEK293-Zellen nachzuweisen: z.B. wurden verschiedene Erst-

Antikörper-Konzentrationen und diverse Zweit-Antikörper verwendet, die Versuche wurden mehrfach auch mit unterschiedlichen Inkubationszeiten wiederholt und es wurden unterschiedliche Membranträger verwendet, um unspezifische Interaktionen mit den Antikörpern zu vermeiden. Dass das Versuchsmodell prinzipiell funktionstüchtig war, konnte anhand des tyrosinnitrierten BSA und anhand der tyrosinnitrierten Zell-Lysate gezeigt werden.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die intakten Zellen in der Lage waren, die Tyrosin-Nitrierung durch Schutzmechanismen zu verhindern, bspw. durch intrazellulär vorkommende Radikal-Fänger oder hocheffektive Denitrasen, so dass die Menge an entstandenem Nitro-Tyrosin unterhalb der Nachweisgrenze gelegen haben könnte. Der Nachweis einer Denitrase ist in der Literatur bislang nicht zu finden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass nitrierte Proteine nicht ausschließlich durch deren Abbau (Turnover) eliminiert werden, sondern auch einem „Recycling“ unterliegen, welcher bspw. durch selektive Denitrasen gesteuert sein könnte (156;164). Durch die in dem soeben vorgestellten Versuch durchgeführte Lyse scheinen eventuell vorhandene Protektionsmechanismen der Zelle aufgehoben worden zu sein, so dass eine unspezifische Nitrierung aller Tyrosin-Reste erfolgte. Letztlich bleibt es unklar, wieso kein Nitro-Tyrosin in der intakten Zelle nachzuweisen war. Somit konnte die Frage, ob eine Tyrosin-Nitrierung des hMR in der intakten Zelle stattfindet, nicht beantwortet werden.

### **5.8 Perspektiven**

Es konnte in der vorliegenden Dissertation gezeigt werden, dass nitrosativer Stress, im Speziellen Peroxynitrit, in der Lage ist, den hMR auch unabhängig von einer Liganden-Bindung zu aktivieren. Demnach besitzt nitrosativer Stress eine pathophysiologische Relevanz, die zur inadäquaten MR-Aktivierung beitragen kann. Die zellulären Mechanismen, die dieser Aktivierung zugrunde liegen, wurden in dieser Arbeit am Beispiel der durch Peroxynitrit hervorgerufenen 3-Nitro-Tyrosin-Bildung als ein möglicher Aspekt betrachtet. Weitere verursachende Mechanismen der unangebrachten MR-Aktivierung könnten anderweitige posttranslationale MR-Modifikationen, die Beeinflussung von Koregulatoren durch Peroxynitrit, die Translokation des MR vom Zytoplasma in den Zellkern und MR-DNA-Interaktionen betreffen, welche Gegenstand weiterer Untersuchungen sein könnten. Interessant wäre es auch, die Wirkung nitrosativen Stresses auf die MR-Aktivierung in anderen Zell-Modellen, bspw. myokard- oder endothelstämmigen Zellen, zu untersuchen. Im nächsten Schritt wäre dann am Tiermodell die in vivo-Beeinträchtigung des MR durch nitrosativen Stress zu überprüfen.

Dann müssten auch exogene Faktoren Berücksichtigung finden, die auf den Organismus einwirken, wie z.B. NO-freisetzende Pharmazeutika bei Hypertonie. Diese könnten auf dem Boden einer endothelialen Dysfunktion mit vermehrter  $O_2^-$ -Bildung zur verstärkten Bildung von

Peroxynitrit beitragen (159). Auf der anderen Seite gibt es den interessanten Ansatz, den Nachweis Tyrosin-nitrierter Plasmaproteine als prognostischen Risikomarker der KHK zu verwenden (171).

Für die Grundlagenforschung und die Klinik werden die Verflechtungen des Mineralokortikoidrezeptors mit nitrosativem Stress in Zukunft weiterhin mit Sicherheit eine Rolle spielen. Zusammenhänge zu diesem Thema wurden bislang kaum untersucht. Bezogen auf die Komplexität und Vielfältigkeit möglicher Ansatzpunkte, Interaktionen und Interpretationen gilt bis dahin wohl folgendes Zitat von Alfred Nobel:

„Die Schwierigkeiten wachsen, je näher man ans Ziel kommt“ (194).

## 6. Zusammenfassung

Der Mineralokortikoidrezeptor ist ein Steroidhormonrezeptor, dessen klassische Wirkung in der Regulation des Elektrolyt-Wasser-Haushaltes sowie Blutdruckes liegt. Abseits davon werden dem MR pathogene Effekte im kardioresnovaskulären System zugeschrieben, die u.a. Fibrose- und Inflammationsvorgänge mit kardialer Hypertrophie, Remodellingprozesse und Bluthochdruckentstehung begünstigen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch weitestgehend ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass bestimmte Umgebungsvoraussetzungen erfüllt sein müssen, um den MR für derart schädliche Folgen zu aktivieren. Stickstoffmonoxid ist ein Signalmolekül, welches u. a. im Endothel gebildet wird und dort Einfluss auf den Gefäßtonus, die Zelladhäsion und auf das Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen ausübt. NO kann zur Bildung nitrosativer Spezies (RNS, *reactive nitrogen species*), wie bspw. Peroxynitrit beitragen, wenn es zu Reaktionen mit ROS (*reactive oxygen species*) unter inflammatorischen Bedingungen kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich Stickstoffmonoxid bzw. nitrosativer Stress, am konkreten Beispiel mit Peroxynitrit, auf die transkriptionelle hMR-Aktivität und auf die hMR-Expression auswirkt. Hierfür wurden diverse Untersuchungen mit 2 nierenstämmigen Zell-Kulturen, OK- und HEK293-Zellen, durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit zeigt:

- OK-Zellen besitzen keinen endogenen MR.
- Sowohl OK- als auch HEK293-Zellen lassen sich mit Plasmiden transfizieren, die für den hMR kodieren und sie exprimieren den hMR als Protein.
- Der exprimierte hMR ist funktionell und dosisabhängig im GRE-SEAP-Reporter-Gen-Assay aktivierbar, wenn er mit den Agonisten Aldosteron oder Dexamethason stimuliert wird.
- Die OK-Zellen lassen sich ebenfalls mit dem hGR-kodierenden Plasmid transfizieren, woraus ein funktionstüchtiges Protein exprimiert wird, das sich durch Dexamethason und Hydrocortison im GRE-SEAP-Reporter-Gen-Assay stimulieren lässt.
- Mittels Griess-Reagenz lässt sich indirekt über eine Nitrit-Entstehung nachweisen, dass die Donoren Sin-1 und SNAP beide NO freisetzen.
- Es ist bekannt, dass Sin-1 zusätzlich  $O_2^-$ -Radikale freisetzt, die mit NO zu Peroxynitrit reagieren. Peroxynitrit bildet mit Protein-Tyrosin-Resten 3-Nitro-Tyrosin, welches im Western Blot am Beispiel des BSA nachweisbar ist. SNAP führt als reiner NO-Donor nicht zur Tyrosin-Nitrierung.

- Die Donor-Reagenzien Sin-1 und SNAP haben keinen zytotoxischen Einfluss auf OK-Zellen und sie beeinflussen weder in OK- noch in HEK293-Zellen die vorhandene Menge des hMR.
- NO inhibiert konzentrationsabhängig die Aktivität des unstimulierten und des Aldosteron-stimulierten hMR, möglicherweise als Ausdruck der vasoprotektiven Funktion von NO.
- Die Aktivität des eng verwandten hGR ließ sich ebenfalls im unstimulierten und im Dexamethason-stimulierten Zustand durch NO reduzieren, wobei auch hier eine „beruhigende“ und damit vasoprotektive Funktion von NO anzunehmen ist.
- Peroxynitrit führt zeit- und konzentrationsabhängig zu einer Aktivitätsstimulation des Aldosteron-ungebundenen hMR. Dies unterstützt die Hypothese, dass ein pathologisches Umgebungsmilieu, hier am Beispiel von Peroxynitrit als Vertreter des nitrosativen und oxidativen Stresses, zur inadäquaten MR-Aktivierung beiträgt.
- Peroxynitrit bewirkt konzentrationsabhängig eine Inhibition der Aldosteron-stimulierten hMR-Aktivität. Vergleichend liegen hierzu in der Literatur unterschiedliche Ergebnisse vor, die eine nähere Untersuchung benötigen.
- Peroxynitrit führt konzentrationsabhängig sowohl beim unstimulierten als auch beim Dexamethason-stimulierten hGR zu einer Aktivitätsabnahme. Eventuell werden somit im pathogenen Umgebungsmilieu die anti-inflammatorischen Eigenschaften des hGR aufgehoben.
- Beim hMR scheint die A/B-Domäne im Versuch mit einer trunkierten Rezeptor-Variante möglicher Angriffsort von Peroxynitrit zu sein.
- Es sollte untersucht werden, ob die Tyrosin-Nitrierung als posttranslationale Proteinmodifikation als Wirkmechanismus einer Peroxynitrit-Anwesenheit in Frage kommt. Der Nachweis einer 3-Nitro-Tyrosin-Bildung durch Peroxynitrit im heterologen Versuchssystem mit nicht lysierten OK- bzw. HEK293-Zellen gelang jedoch nicht.

Schlussfolgernd besitzt Peroxynitrit als Vertreter nitrosativen Stresses eine pathophysiologische Bedeutung bei der Liganden-unabhängigen MR-Aktivierung. Der genaue Wirkmechanismus bedarf jedoch noch weiterführender Untersuchungen.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) SIMPSON SA, TAIT JF, WETTSTEIN A, NEHER R, VON EUW J, REICHSTEIN T. [Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism]. *Experientia* 1953; 9(9):333-335.
- (2) Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987; 237(4812):268-275.
- (3) Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ* 2002; 26(1-4):8-20.
- (4) Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol* 2014; 4(3):965-994.
- (5) Gekle M, Grossmann C. Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Arch* 2009; 458(2):231-246.
- (6) Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F et al. The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 15(1):79-87.
- (7) Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A 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):709-717.
- (8) Leitlinie Herzinsuffizienz; [http://leitlinien.dgk.org/files/2013\\_Pocket-Leitlinien\\_Herzinsuffizienz\\_Update\\_2012\\_Internet.pdf](http://leitlinien.dgk.org/files/2013_Pocket-Leitlinien_Herzinsuffizienz_Update_2012_Internet.pdf); Abrufdatum: 25.01.2017.
- (9) Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B et al. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* 2005; 19(7):1697-1710.
- (10) Le Moellic C, Ouvrard-Pascaud A, Capurro C, Cluzeaud F, Fay M, Jaisser F 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):1145-1160.
- (11) Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S, Schenk K, Marschitz I, Schramek H. Rapid activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinase ERK1/2. *Pflugers Arch* 2001; 441(6):781-786.
- (12) Haseroth K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Gunther A, Herbst C et al. Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266(1):257-261.
- (13) Christ M, Meyer C, Sippel K, Wehling M. Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C  $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213(1):123-129.
- (14) Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005; 45(4):773-779.
- (15) Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol* 2005; 19(9):2211-2221.
- (16) Weinberger C, Hollenberg SM, Ong ES, Harmon JM, Brower ST, Cidlowski J et al. Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science* 1985; 228(4700):740-742.
- (17) Benbrook D, Pfahl M. A novel thyroid hormone receptor encoded by a cDNA clone from a human testis library. *Science* 1987; 238(4828):788-791.



- (18) Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; 330(6147):444-450.
- (19) Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR et al. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(10):3294-3298.
- (20) Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240(4854):889-895.
- (21) Fuller PJ, Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 2005; 46(6):1227-1235.
- (22) Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 2007; 5:e012.
- (23) de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998; 19(3):269-301.
- (24) Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H et al. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na<sup>+</sup> metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(16):9424-9429.
- (25) Pippal JB, Fuller PJ. Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 2008; 41(6):405-413.
- (26) Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F, Fuller PJ. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J Biol Chem* 1995; 270(36):21016-21020.
- (27) Morrison N, Harrap SB, Arriza JL, Boyd E, Connor JM. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum Genet* 1990; 85(1):130-132.
- (28) Fan YS, Eddy RL, Byers MG, Haley LL, Henry WM, Nowak NJ et al. The human mineralocorticoid receptor gene (MLR) is located on chromosome 4 at q31.2. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 52(1-2):83-84.
- (29) Yudit MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 2002; 16(8):1719-1726.
- (30) Zennaro MC, Le Menuet D, Lombes M. Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. *Mol Endocrinol* 1996; 10(12):1549-1560.
- (31) Le Menuet D, Viengchareun S, Penfornis P, Walker F, Zennaro MC, Lombes M. 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):7878-7886.
- (32) Tallec LP, Kirsh O, Lecomte MC, Viengchareun S, Zennaro MC, Dejean A 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):2529-2542.
- (33) Fuse H, Kitagawa H, Kato S. Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Mol Endocrinol* 2000; 14(6):889-899.
- (34) Walther RF, Atlas E, Carrigan A, Rouleau Y, Edgecombe A, Visentin L et al. A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem* 2005; 280(17):17549-17561.

- (35) Skott O, Uhrenholt TR, Schjerning J, Hansen PB, Rasmussen LE, Jensen BL. Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease--friend or foe? *Pharmacol Ther* 2006; 111(2):495-507.
- (36) Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(26):12480-12484.
- (37) Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 2001; 11(22):1749-1758.
- (38) Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:451-486.
- (39) Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA et al. Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol* 2001; 21(3):781-793.
- (40) Fagart J, Huyet J, Pinon GM, Rochel M, Mayer C, Rafestin-Oblin ME. Crystal structure of a mutant mineralocorticoid receptor responsible for hypertension. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(6):554-555.
- (41) Bledsoe RK, Madauss KP, Holt JA, Apolito CJ, Lambert MH, Pearce KH et al. A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2005; 280(35):31283-31293.
- (42) Li Y, Suino K, Daugherty J, Xu HE. Structural and biochemical mechanisms for the specificity of hormone binding and coactivator assembly by mineralocorticoid receptor. *Mol Cell* 2005; 19(3):367-380.
- (43) Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 1997; 387(6634):733-736.
- (44) Lombes M, Binart N, Delahaye F, Baulieu EE, Rafestin-Oblin ME. Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem J* 1994; 302 ( Pt 1):191-197.
- (45) Grossmann C, Freudinger R, Mildenerberger S, Husse B, Gekle M. EF domains are sufficient for nongenomic mineralocorticoid receptor actions. *J Biol Chem* 2008; 283(11):7109-7116.
- (46) Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997; 18(3):306-360.
- (47) Nishi M, Ogawa H, Ito T, Matsuda KI, Kawata M. Dynamic changes in subcellular localization of mineralocorticoid receptor in living cells: in comparison with glucocorticoid receptor using dual-color labeling with green fluorescent protein spectral variants. *Mol Endocrinol* 2001; 15(7):1077-1092.
- (48) Grossmann C, Gekle M. Non-classical actions of the mineralocorticoid receptor: misuse of EGF receptors? *Mol Cell Endocrinol* 2007; 277(1-2):6-12.
- (49) Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerberger S, Voelker K, Gekle M. Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292(6):E1790-E1800.
- (50) Trapp T, Holsboer F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17(4):145-149.
- (51) Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, Holsboer F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 1994; 13(6):1457-1462.
- (52) Faresse N. Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 143:334-342.

- (53) Funder JW. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 2005; 26(3):313-321.
- (54) Tirard M, Almeida OF, Hutzler P, Melchior F, Michaelidis TM. Sumoylation and proteasomal activity determine the transactivation properties of the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 268(1-2):20-29.
- (55) Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol* 2002; 22(14):5222-5234.
- (56) Fan M, Long X, Bailey JA, Reed CA, Osborne E, Gize EA et al. The activating enzyme of NEDD8 inhibits steroid receptor function. *Mol Endocrinol* 2002; 16(2):315-330.
- (57) Kang SH, Seok YM, Song MJ, Lee HA, Kurz T, Kim I. Histone deacetylase inhibition attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis through acetylation of mineralocorticoid receptor in spontaneously hypertensive rats. *Mol Pharmacol* 2015; 87(5):782-791.
- (58) Galigniana MD, Piwien-Pilipuk G, Assrey J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 1999; 55(2):317-323.
- (59) Ruhs S, Stratz N, Schlor K, Meinel S, Mildenerberger S, Rabe S et al. Modulation of transcriptional mineralocorticoid receptor activity by nitrosative stress. *Free Radic Biol Med* 2012; 53(5):1088-1100.
- (60) Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87(1):315-424.
- (61) Piwien-Pilipuk G, Ayala A, Machado A, Galigniana MD. Impairment of mineralocorticoid receptor (MR)-dependent biological response by oxidative stress and aging: correlation with post-translational modification of MR and decreased ADP-ribosylatable level of elongating factor 2 in kidney cells. *J Biol Chem* 2002; 277(14):11896-11903.
- (62) Ortlund EA, Bridgham JT, Redinbo MR, Thornton JW. Crystal structure of an ancient protein: evolution by conformational epistasis. *Science* 2007; 317(5844):1544-1548.
- (63) Baker ME. Adrenal and sex steroid receptor evolution: environmental implications. *J Mol Endocrinol* 2001; 26(2):119-125.
- (64) Johnson JP. Cellular mechanisms of action of mineralocorticoid hormones. *Pharmacol Ther* 1992; 53(1):1-29.
- (65) Odermatt A, Arnold P, Frey FJ. The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Biol Chem* 2001; 276(30):28484-28492.
- (66) Agarwal AK, Auchus RJ. Minireview: cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency. *Endocrinology* 2005; 146(6):2531-2538.
- (67) Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(2):F181-F192.
- (68) Li KX, Obeyesekere VR, Krozowski ZS, Ferrari P. Oxoreductase and dehydrogenase activities of the human and rat 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Endocrinology* 1997; 138(7):2948-2952.
- (69) Funder JW. Mineralocorticoid receptors and cardiovascular damage: it's not just aldosterone. *Hypertension* 2006; 47(4):634-635.
- (70) Funder JW. RALES, EPHESUS and redox. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 93(2-5):121-125.
- (71) Kitagawa H, Yanagisawa J, Fuse H, Ogawa S, Yogiashi Y, Okuno A et al. Ligand-selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol* 2002; 22(11):3698-3706.
- (72) Hultman ML, Krasnoperova NV, Li S, Du S, Xia C, Dietz JD et al. The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol Endocrinol* 2005; 19(6):1460-1473.

- (73) Rogerson FM, Fuller PJ. Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 200(1-2):45-55.
- (74) Fuller PJ, Yao Y, Yang J, Young MJ. Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *J Endocrinol* 2012; 213(1):15-24.
- (75) Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S, Meduri G, Thirman MJ, Lombes M. The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol Endocrinol* 2005; 19(5):1158-1169.
- (76) Obradovic D, Tirard M, Nemethy Z, Hirsch O, Gronemeyer H, Almeida OF. DAXX, FLASH, and FAF-1 modulate mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated transcription in hippocampal cells--toward a basis for the opposite actions elicited by two nuclear receptors? *Mol Pharmacol* 2004; 65(3):761-769.
- (77) Yokota K, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Suda N, Murai-Takeda A et al. Coactivation of the N-terminal transactivation of mineralocorticoid receptor by Ubc9. *J Biol Chem* 2007; 282(3):1998-2010.
- (78) Murai-Takeda A, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Suda N et al. NF-YC functions as a corepressor of agonist-bound mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem* 2010; 285(11):8084-8093.
- (79) Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(1):E11-E24.
- (80) Stefan Silbernagl, Agamemnon Despopoulos. Taschenatlas Physiologie. 7. Auflage, 2007 ed. Stuttgart: Thieme, 16 A.D.
- (81) MacKenzie SM, Connell JM, Davies E. Non-adrenal synthesis of aldosterone: a reality check. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 350(2):163-167.
- (82) Yamamoto N, Yasue H, Mizuno Y, Yoshimura M, Fujii H, Nakayama M et al. Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension. *Hypertension* 2002; 39(5):958-962.
- (83) Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, Sakamoto T, Ogawa H, Kugiyama K et al. Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans. *Circulation* 2001; 103(1):72-77.
- (84) Yu L, Romero DG, Gomez-Sanchez CE, Gomez-Sanchez EP. Steroidogenic enzyme gene expression in the human brain. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 190(1-2):9-17.
- (85) MacKenzie SM, Fraser R, Connell JM, Davies E. Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002; 3(4):214-221.
- (86) Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Foecking MF, Gomez-Sanchez EP. Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 1997; 138(8):3369-3373.
- (87) Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217(1-2):203-212.
- (88) Funder JW, Feldman D, Edelman IS. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *J Steroid Biochem* 1972; 3(2):209-218.
- (89) Kenouch S, Lombes M, Delahaye F, Eugene E, Bonvalet JP, Farman N. Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79(5):1334-1341.
- (90) Lombes M, Claire M, Pinto M, Michaud A, Rafestin-Oblin ME. Aldosterone binding in the human colon carcinoma cell line HT29: correlation with cell differentiation. *J Steroid Biochem* 1984; 20(1):329-333.
- (91) Naray-Fejes-Toth A, Rusvai E, Fejes-Toth G. Mineralocorticoid receptors and 11 beta-steroid dehydrogenase activity in renal principal and intercalated cells. *Am J Physiol* 1994; 266(1 Pt 2):F76-F80.

- (92) Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD et al. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994; 367(6462):463-467.
- (93) Feraille E, Mordasini D, Gonin S, Deschenes G, Vinciguerra M, Doucet A et al. Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 986:570-578.
- (94) Verrey F. Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. *J Membr Biol* 1995; 144(2):93-110.
- (95) Henry PC, Kanelis V, O'Brien MC, Kim B, Gautschi I, Forman-Kay J et al. Affinity and specificity of interactions between Nedd4 isoforms and the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 2003; 278(22):20019-20028.
- (96) Warnock DG. Liddle syndrome: an autosomal dominant form of human hypertension. *Kidney Int* 1998; 53(1):18-24.
- (97) Snyder PM, Price MP, McDonald FJ, Adams CM, Volk KA, Zeiher BG et al. Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Cell* 1995; 83(6):969-978.
- (98) Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 2001; 104(4):545-556.
- (99) Schild L. The ENaC channel as the primary determinant of two human diseases: Liddle syndrome and pseudohypoaldosteronism. *Nephrologie* 1996; 17(7):395-400.
- (100) Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 1994; 79(3):407-414.
- (101) Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 1995; 11(1):76-82.
- (102) McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, Pearce D. SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20:134-139.
- (103) Beguin P, Crambert G, Guennoun S, Garty H, Horisberger JD, Geering K. CHIF, a member of the FXYP protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J* 2001; 20(15):3993-4002.
- (104) Soundararajan R, Pearce D, Ziera T. The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 350(2):242-247.
- (105) Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA et al. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na<sup>+</sup> channel cell surface expression. *EMBO J* 2001; 20(24):7052-7059.
- (106) Samavat S, Ahmadpoor P, Samadian F. Aldosterone, hypertension, and beyond. *Iran J Kidney Dis* 2011; 5(2):71-76.
- (107) Diakov A, Korbmacher C. A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *J Biol Chem* 2004; 279(37):38134-38142.
- (108) Wang J, Barbry P, Maiyar AC, Rozansky DJ, Bhargava A, Leong M et al. SGK integrates insulin and mineralocorticoid regulation of epithelial sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280(2):F303-F313.
- (109) Spindler B, Mastroberardino L, Custer M, Verrey F. Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflugers Arch* 1997; 434(3):323-331.
- (110) Busjahn A, Aydin A, Uhlmann R, Krasko C, Bähring S, Szelestey T et al. Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension* 2002; 40(3):256-260.

- (111) Gimelreich D, Popovtzer MM, Wald H, Pizov G, Berlatzky Y, Rubinger D. Regulation of ROMK and channel-inducing factor (CHIF) in acute renal failure due to ischemic reperfusion injury. *Kidney Int* 2001; 59(5):1812-1820.
- (112) Mihailidou AS, Mardini M, Funder JW. Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C. *Endocrinology* 2004; 145(2):773-780.
- (113) Funder JW. Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology* 2006; 147(12):5564-5567.
- (114) Zhu Y, Bond J, Thomas P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(5):2237-2242.
- (115) Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005; 307(5715):1625-1630.
- (116) Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005; 146(2):624-632.
- (117) Eisen C, Meyer C, Christ M, Theisen K, Wehling M. Novel membrane receptors for aldosterone in human lymphocytes: a 50 kDa protein on SDS-PAGE. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 1994; 40(3):351-358.
- (118) Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN, Park JK, Dechend R, Bieringer M et al. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 2001; 37(2 Pt 2):787-793.
- (119) Kagiya S, Qian K, Kagiya T, Phillips MI. Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 2003; 41(3 Pt 2):824-829.
- (120) Flamant M, Tharaux PL, Placier S, Henrion D, Coffman T, Chatziantoniou C et al. Epidermal growth factor receptor trans-activation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J* 2003; 17(2):327-329.
- (121) Alzamora R, Michea L, Marusic ET. Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension* 2000; 35(5):1099-1104.
- (122) Wehling M, Kasmayr J, Theisen K. Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am J Physiol* 1991; 260(5 Pt 1):E719-E726.
- (123) Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, Christ M. Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204(2):475-481.
- (124) Doolan CM, Harvey BJ. Modulation of cytosolic protein kinase C and calcium ion activity by steroid hormones in rat distal colon. *J Biol Chem* 1996; 271(15):8763-8767.
- (125) Liu SL, Schmuck S, Choraczewski JZ, Gros R, Feldman RD. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation* 2003; 108(19):2400-2406.
- (126) Christ M, Douwes K, Eisen C, Bechtner G, Theisen K, Wehling M. Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1995; 25(1):117-123.
- (127) Sato A, Liu JP, Funder JW. Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Endocrinology* 1997; 138(8):3410-3416.
- (128) Pfau A, Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Benesic A, Gekle M. 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):35-43.

- (129) Gekle M, Mildenerger S, Freudinger R, Grossmann C. Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. *Pflugers Arch* 2007; 454(3):403-413.
- (130) Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol* 2002; 161(5):1773-1781.
- (131) Wehling M, Spes CH, Win N, Janson CP, Schmidt BM, Theisen K et al. Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(10):3517-3522.
- (132) Rad AK, Balment RJ, Ashton N. Rapid natriuretic action of aldosterone in the rat. *J Appl Physiol* (1985 ) 2005; 98(2):423-428.
- (133) Gomez-Sanchez EP. Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: minority rule? *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22(5):179-187.
- (134) Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992; 120(6):893-901.
- (135) Qin W, Rudolph AE, Bond BR, Rocha R, Blomme EA, Goellner JJ et al. Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 2003; 93(1):69-76.
- (136) McCurley A, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 350(2):256-265.
- (137) Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 1999; 33(4):981-986.
- (138) Marney AM, Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113(6):267-278.
- (139) Lalevee N, Rebsamen MC, Barrere-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Benitah JP et al. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005; 67(2):216-224.
- (140) Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348(14):1309-1321.
- (141) Pitt B. Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHEsus studies. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217(1-2):53-58.
- (142) Brody MJ, Varner KJ, Vasquez EC, Lewis SJ. Central nervous system and the pathogenesis of hypertension. Sites and mechanisms. *Hypertension* 1991; 18(5 Suppl):III7-12.
- (143) Brody MJ. Central nervous system and mechanisms of hypertension. *Clin Physiol Biochem* 1988; 6(3-4):230-239.
- (144) de Kloet ER, Van Acker SA, Sibug RM, Oitzl MS, Meijer OC, Rahmouni K et al. Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int* 2000; 57(4):1329-1336.
- (145) Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000; 27(4):313-319.
- (146) Gao Y. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch* 2010; 459(6):829-839.
- (147) Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100(9):2146-2152.
- (148) Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33(7):829-837d.
- (149) Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3):385-400.

- (150) Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* 2013; 1(1):244-257.
- (151) Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev* 2009; 2(5):259-269.
- (152) Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998; 391(6663):169-173.
- (153) Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851(1-2):51-70.
- (154) Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003; 22(37):5734-5754.
- (155) Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986; 78(1):1-5.
- (156) Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(2):L262-L268.
- (157) Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994; 368(6474):850-853.
- (158) Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(3):556-592.
- (159) Sohn HY, Krotz F, Zahler S, Gloe T, Keller M, Theisen K et al. Crucial role of local peroxynitrite formation in neutrophil-induced endothelial cell activation. *Cardiovasc Res* 2003; 57(3):804-815.
- (160) Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* 2004; 25(1-2):17-26.
- (161) Yeo WS, Lee SJ, Lee JR, Kim KP. Nitrosative protein tyrosine modifications: biochemistry and functional significance. *BMB Rep* 2008; 41(3):194-203.
- (162) Bigelow DJ. Nitrotyrosine-modified SERCA2: a cellular sensor of reactive nitrogen species. *Pflugers Arch* 2009; 457(3):701-710.
- (163) Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res* 2007; 75(2):291-302.
- (164) Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305(3):776-783.
- (165) Kamisaki Y, Wada K, Bian K, Balabanli B, Davis K, Martin E et al. An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosine-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(20):11584-11589.
- (166) Deeb RS, Nuriel T, Cheung C, Summers B, Lamon BD, Gross SS et al. Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305(5):H687-H698.
- (167) Osoata GO, Ito M, Elliot M, Hogg J, Barnes PJ, Ito K. Reduced denitration activity in peripheral lung of chronic obstructive pulmonary disease. *Tanaffos* 2012; 11(4):23-29.
- (168) Toda N, Nakanishi S, Tanabe S. Aldosterone affects blood flow and vascular tone regulated by endothelium-derived NO: therapeutic implications. *Br J Pharmacol* 2013; 168(3):519-533.
- (169) Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001; 103(9):1282-1288.



- (170) Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, Kuroi A, Kobayashi K, Muragaki Y et al. Addition of eplerenone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor effectively improves nitric oxide bioavailability. *Hypertension* 2008; 51(3):734-741.
- (171) Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL et al. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003; 289(13):1675-1680.
- (172) Newfell BG, Iyer LK, Mohammad NN, McGraw AP, Ehsan A, Rosano G et al. Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(8):1871-1880.
- (173) Iida T, Makino Y, Okamoto K, Yoshikawa N, Makino I, Nakamura T et al. Functional modulation of the mineralocorticoid receptor by cis-diamminedichloroplatinum (II). *Kidney Int* 2000; 58(4):1450-1460.
- (174) Lupo B, Mesnier D, Auzou G. Cysteines 849 and 942 of human mineralocorticoid receptor are crucial for steroid binding. *Biochemistry* 1998; 37(35):12153-12159.
- (175) Vrtovsnik F, Jourdain M, Cherqui G, Lefebvre J, Friedlander G. Glucocorticoid inhibition of Na-Pi cotransport in renal epithelial cells is mediated by protein kinase C. *J Biol Chem* 1994; 269(12):8872-8877.
- (176) Meinel S, Ruhs S, Schumann K, Stratz N, Trenkmann K, Schreier B et al. Mineralocorticoid receptor interaction with SP1 generates a new response element for pathophysiologically relevant gene expression. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(17):8045-8060.
- (177) Ouvrard-Pascaud A, Puttini S, Sainte-Marie Y, Athman R, Fontaine V, Cluzeaud F et al. Conditional gene expression in renal collecting duct epithelial cells: use of the inducible Cre-lox system. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(1):F180-F187.
- (178) Lane RD, Federman D, Flora JL, Beck BL. Computer-assisted determination of protein concentrations from dye-binding and bicinchoninic acid protein assays performed in microtiter plates. *J Immunol Methods* 1986; 92(2):261-270.
- (179) Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111(2):229-233.
- (180) Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC et al. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* 1997; 1(2):177-189.
- (181) Griess JP. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH: Wesely und Benedikt "Über einige Azoverbindungen.". *Ber Deutsch Chem Ges* 1879; 12:426-428.
- (182) SNAP-Strukturformel.  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/N7927>; Abrufdatum: 25.01.2017.
- (183) Formel von Sin-1 und NO-Freisetzung aus Sin-1 und SNAP;  
<https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide/probes-for-nitric-oxide-research.html>; Abrufdatum: 25.01.2017.
- (184) Trackey JL, Uliasz TF, Hewett SJ. SIN-1-induced cytotoxicity in mixed cortical cell culture: peroxynitrite-dependent and -independent induction of excitotoxic cell death. *J Neurochem* 2001; 79(2):445-455.
- (185) Bohn H, Schonafinger K. Oxygen and oxidation promote the release of nitric oxide from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14 Suppl 11:S6-12.
- (186) Feelisch M, Ostrowski J, Noack E. On the mechanism of NO release from sydnonimines. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; 14 Suppl 11:S13-S22.
- (187) Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 1994; 135(3):834-840.

- (188) WHO. WHO-Kardiovaskuläre Erkrankungen als weltweit führende Todesursache. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>; Abrufdatum: 25.01.2017.
- (189) Bauersachs J, Fraccarollo D. More NO-no more ROS: combined selective mineralocorticoid receptor blockade and angiotensin-converting enzyme inhibition for vascular protection. *Hypertension* 2008; 51(3):624-625.
- (190) Nagase M, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Ishizawa K, Ueda K, Yoshida S et al. Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1. *Hypertension* 2012; 59(2):500-506.
- (191) Wang H, Shimosawa T, Matsui H, Kaneko T, Ogura S, Uetake Y et al. Paradoxical mineralocorticoid receptor activation and left ventricular diastolic dysfunction under high oxidative stress conditions. *J Hypertens* 2008; 26(7):1453-1462.
- (192) Okamoto K, Tanaka H, Ogawa H, Makino Y, Eguchi H, Hayashi S et al. Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1999; 274(15):10363-10371.
- (193) Hadoke PW, Kipari T, Seckl JR, Chapman KE. Modulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase as a strategy to reduce vascular inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2013; 15(5):320.
- (194) Zitat Alfred Nobel; [www.nur-zitate.com/autor/Alfred\\_Nobel](http://www.nur-zitate.com/autor/Alfred_Nobel); Abrufdatum: 25.01.2017.

## 8. Thesen

1. Der humane Mineralokortikoidrezeptor (hMR) weist neben seiner physiologischen Bedeutung für den Wasser-/Elektrolyt-Haushalt und Blutdruck auch pathophysiologische Effekte auf und ist an der Entstehung kardioresnovaskulärer Erkrankungen über die Förderung von Fibrose, Inflammation und endothelialer Dysfunktion beteiligt.
2. Bestimmte Begleitfaktoren sind zur pathogenen hMR-Aktivierung notwendig. Einer dieser Faktoren sind reaktive Stickstoffspezies (RNS). Im heterologen Zellexpressionssystem (OK-Zellen) bewirken Stickstoffmonoxid (NO) und das reaktive Derivat Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) eine Modulation der transkriptionellen hMR-Aktivität.
3. NO führt in OK-Zellen konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der hMR-Aktivität sowohl im unstimulierten als auch im Aldosteron-stimulierten Zustand, möglicherweise als Ausdruck der vasoprotektiven Funktion von NO.
4. ONOO<sup>-</sup> steigert in OK-Zellen zeit- und konzentrationsabhängig die Aktivität des unstimulierten hMR. Dies unterstützt die Hypothese, dass reaktive Stickstoffspezies zur inadäquaten hMR-Aktivierung beitragen.
5. Der humane Glukokortikoidrezeptor (hGR) ist der engste Verwandte des hMR. NO und ONOO<sup>-</sup> hemmen beide die Aktivität sowohl des freien hGR als auch des Dexamethason-stimulierten hGR in OK-Zellen. Möglicherweise unterstützt NO somit seine vasoprotektive Funktion. Die Bedeutung von ONOO<sup>-</sup> auf die hGR-Aktivität bedarf weiterer Klärung.
6. Die transkriptionelle Aktivität der trunkierten MR-Variante CDEF wird durch ONOO<sup>-</sup> anders als beim nicht gekürzten hMR nach Aldosteron-Stimulation in OK-Zellen stimuliert. Die MR-A/B-Domäne könnte somit Angriffspunkt von ONOO<sup>-</sup> sein.
7. ONOO<sup>-</sup> als Stellvertreter für RNS ist in der Lage, Protein-Tyrosin-Reste als posttranslationale Modifikation zu nitrieren. Die Bildung von 3-Nitro-Tyrosin ist mit dem verwendeten ONOO<sup>-</sup>-Donor Sin-1 möglich, eine entsprechende Tyrosin-Nitrierung von Rinderalbumin ist im Western Blot darstellbar.
8. In OK- und HEK293-Zellen lässt sich nach ONOO<sup>-</sup>-Einwirkung keine Tyrosin-Nitrierung nachweisen. Erst nach Lyse der Zellen ist eine unspezifische Tyrosin-Nitrierung darstellbar.
9. Ein Nachweis einer spezifischen Tyrosin-Nitrierung als Folge nitrosativen Stresses am hMR war nicht möglich. Methodische Ursachen sind dabei wahrscheinlicher als eine Nichtmodifikation des hMR.
10. Anders als in der Literatur oftmals beschrieben, scheinen reaktive Stickstoff-Spezies als Ausdruck des zellulären Redox-Status nicht nur Folge einer inadäquaten hMR-Aktivierung, sondern auch Ursache dessen zu sein.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung der Arbeit habe ich keine fremden Unterstützungsleistungen erhalten.

Aus anderen Arbeiten wörtlich oder inhaltlich entnommene Textstellen oder Konzepte wurden ausdrücklich als solche gekennzeichnet und als Quellen angegeben.

---

Kathleen Schlör

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass ich außer dieser Arbeit keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Dies ist mein erstes Promotionsverfahren.

---

Kathleen Schlör

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Kathleen Schlör  
Geburtsdatum: 13.07.1985  
Geburtsort: Halle / Saale  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung

1992 – 1996 Grundschule Trotha in Halle / Saale  
1996 – 2005 Burg-Gymnasium Wettin  
Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

2005 – 2011 Studium der Humanmedizin  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### Ärztliche Tätigkeit

Seit 01.06.2012 Ärztin in Weiterbildung, Klinik für Innere Medizin  
Helios Klinikum Köthen  
11/2015 – 01/2017 Unterbrechung wegen Elternzeit

### Promotion

2008 – 2017 Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

## Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle für die Möglichkeit zur Promotion sowie der freundlichen Überlassung des Themas. Ihre lehrreichen Vorlesungen und Seminare sowie Ihr Engagement für die Belange der Studenten waren der Grund, eine Promotion im Julius Bernstein-Institut für Physiologie anzustreben.

Zudem geht ein besonderer Dank an PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt für die unglaublich hilfreiche Unterstützung und Motivation insbesondere während der Anfertigung des schriftlichen Teils der Dissertation. Die Zeit der Zusammenarbeit, Diskussion, konstruktiven Kritik und Seelenpflege mit nicht-fachlichen Belangen ist von unschätzbarem Wert.

Ich bedanke mich weiterhin bei der gesamten Arbeitsgruppe des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie. Alle haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Sindy Rabe danke ich herzlichst für die äußerst geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit zu Beginn meiner Promotionstätigkeit. Außerdem möchte ich mich für die Betreuung und Hilfe in labortechnischen Angelegenheiten bei Sigrid Mildenberger, Katja Schumann, Bettina Schneider und Nicole Strätz bedanken. Ihr habt für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt. Es war mir ein Vergnügen, mit euch zusammen arbeiten zu dürfen und ich werde mich immer mit Freude daran zurück erinnern.

Auch bei den weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern, insbesondere Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claudia Grossmann, Dr. med. vet. Barbara Schreier, Dr. rer. nat. Anne Riemann und Dr. rer. nat. Stefanie Ruhs danke ich für die stets vorhandenen und bereitwillig erteilten fachlichen Ratschläge sowie lieben Worte.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern. Für die Liebe, mit der ihr mich begleitet und vorbehaltlos unterstützt, kann man nicht oft genug Dankeschön sagen!

Nicht zuletzt gebührt meinem Lebensgefährten Matthias Bonnke großer Dank, der mich stets zur Fertigstellung dieser Arbeit ermutigt hat. Dir und unserer Tochter verdanke ich so viel!