

# **Interaktion zwischen der Signaltransduktion von Aldosteron/Mineralocorticoidrezeptor und epidermalem Wachstumsfaktorrezeptor**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Claudia Großmann  
aus Berlin

Würzburg 2006

Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter : Prof. Dr. M. Gekle

Gutachter: Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
1. Einleitung .....	5
1.1. MINERALOCORTICOIDREZEPTOR (MR) .....	5
1.1.1. Gen.....	5
1.1.2. Protein.....	6
1.1.3. Posttranslationale Modifikationen .....	7
1.1.4. Koaktivatoren und Korepressoren des MR .....	8
1.1.5. Mineralocorticoid-Selektivität.....	9
1.1.6. Endogener Ligand Aldosteron.....	10
1.1.7. Funktionsweise des MR .....	11
1.1.8. Wirkungen von Aldosteron/MR .....	12
1.2. EPIDERMALER WACHSTUMSFAKTORREZEPTOR (EGFR) .....	19
1.2.1. Gen.....	20
1.2.2. Protein.....	20
1.2.4. Funktionsweise des EGFR .....	22
1.2.5. Nukleärer EGFR.....	27
1.3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	27
2. Materialien und Methoden .....	29
2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	29
2.1.1. Phenol-Extraktion.....	29
2.1.2. Ethanol-Fällung .....	29
2.1.3. Isolierung von genomischer DNA .....	29
2.1.4. Isolierung von Plasmiden.....	29
2.1.5. Isolierung von RNA.....	29
2.1.6. Quantifizierung von DNA und RNA .....	29
2.1.7. DNA-Gelelektrophorese .....	30
2.1.8. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	30
2.1.9. Restriktion von DNA-Fragmenten.....	30
2.1.10. Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	30
2.1.11. TA Cloning.....	31
2.1.12. Herstellen kompetenter Bakterien .....	31
2.1.13. Transformation von kompetenten Bakterien .....	31
2.1.14. PCR.....	32
2.1.15. RT-PCR.....	32
2.1.16. Sequenzierung .....	33
2.1.17. Herstellung von Plasmiden.....	33
2.2. REPORTER-GEN-ASSAYS .....	36
2.2.1. EGFR-Promotor -Studien.....	36
2.2.2. GRE-Reporter- Gen-Assay .....	37
2.3. ZELLKULTUR.....	38
2.3.1. Zelllinien .....	38
2.3.2. Primärzellkulturen .....	38
2.3.3. Transiente Transfektionen.....	39
2.3.4. Herstellung stabiler Zellklone .....	39
2.4. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....	39
2.4.1. Herstellung von Zelllysaten .....	39
2.4.2. Isolierung von nukleären Proteinen .....	40
2.4.3. Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag.....	41
2.4.4. Proteingehaltbestimmung.....	41
2.4.5. ELISA .....	42
2.4.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	44
2.4.7. Immunfluoreszenz .....	46
2.4.8. Immunopräzipitation / Koimmunopräzipitation .....	46
2.5. CHROMATINIMMUNOPRÄZIPITATION .....	47

2.6. CALCIUMMESSUNGEN .....	48
2.7. EGFP-FLUORESCENZ .....	48
2.8. TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN.....	49
2.9. TRANSMONOLAYER EXPERIMENTE.....	49
2.9.1. Bestimmung des Kurzschlussstroms und des transepithelialen Widerstandes .....	49
2.9.2. Zählung von Zelldomen .....	49
2.10. MATERIALIEN .....	50
2.11. BIOINFORMATIK .....	50
2.12. STATISTIK .....	50
3. Ergebnisse .....	51
3.1. ALDOSTERON-INDUZIERTER EGFR-EXPRESSION .....	51
3.1.1. CHO-Zellen.....	51
3.1.2. MDCK-C11-Zellen.....	58
3.1.3. Primärzellen (RPTEC, HAoSMC).....	59
3.1.4. In-vivo-Versuche mit Wistar-Ratten.....	60
3.2. MOLEKULARE GRUNDLAGEN FÜR ALDOSTERON-INDUZIERTER EGFR-EXPRESSION .....	63
3.2.1. Promotoruntersuchungen .....	63
3.2.2. Etablierung eines CHIP-Assays für den MR.....	64
3.2.3. Nachweis der MR/EGFR-Promotor-Interaktion.....	65
3.2.4. Beteiligte EGFR-Promotor-Region an Interaktion mit MR .....	65
3.2.5. Beteiligte MR-Domänen an Interaktion mit EGFR-Promotor .....	67
3.3. HINWEISE FÜR EINE PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG.....	68
3.4. EINFLUSS DER VERMEHRTEN EGFR-EXPRESSION AUF DIE ALDOSTERON-INDUZIERTER NATRIUMRESORPTION IN DER NIERE – HINWEISE FÜR EINE NEGATIVE RÜCKKOPPLUNGSSCHLEIFE....	70
3.5. NICHT-GENOTROPE EFFEKTE VON ALDOSTERON .....	77
3.5.1. ERK-Phosphorylierung.....	77
3.5.2. JNK-Phosphorylierung .....	86
3.5.3. p38-Phosphorylierung.....	89
3.5.4. Calcium.....	89
3.6. EINFLUSS DER NICHT-GENOTROPEN AUF DIE GENOMISCHEN ALDOSTERON-EFFEKTE .....	92
4. Diskussion .....	97
4.1. ALDOSTERON-INDUZIERTER EGFR-EXPRESSION .....	97
4.2. MOLEKULARE GRUNDLAGE DER VERMEHRTEN EGFR-EXPRESSION .....	101
4.3. EINFLUSS DER ALDOSTERON-INDUZIERTEN EGFR-EXPRESSION AUF DIE NATRIUMRESORPTION.	104
4.4. NICHT-GENOMISCHE EFFEKTE.....	107
4.5. INTERAKTION ZWISCHEN GENOMISCHEN UND NICHT-GENOTROPEN EFFEKTEN.....	112
4.6. ZUKÜNFTIGE UNTERSUCHUNGEN .....	113
5. Summary .....	115
6. Zusammenfassung .....	117
7. Literatur.....	119
8. Danksagungen .....	149
9. Lebenslauf.....	151
10. Publikationen.....	153
11. Erklärungen .....	155

# 1. Einleitung

## 1.1. Mineralocorticoidrezeptor (MR)

Der Mineralocorticoidrezeptor (NR3C2) bildet zusammen mit dem Progesteronrezeptor, dem Androgenrezeptor, dem Östrogenrezeptor und dem Glucocorticoidrezeptor (GR) die Familie der klassischen Steroidrezeptoren, die wiederum zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört. Es handelt sich um ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren<sup>(1-3)</sup>. Der endogene Ligand des humanen MR ist Aldosteron, wobei das Glucocorticoid Cortisol in vitro mit vergleichbarer Affinität an den MR binden kann<sup>(4-6)</sup>. Es wird angenommen, dass MR und GR in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer mit Cortisol bzw. 11-Desoxycorticosteron als endogenen Liganden entstanden sind<sup>(7)</sup>. Im Laufe der Evolution erwarben Organismen dann die Fähigkeit Aldosteron zu synthetisieren, doch während der GR durch Mutationen seine Aktivierbarkeit durch Aldosteron verlor, behielt der MR diese Fähigkeit bei<sup>(8)</sup>.

### 1.1.1. Gen

Das Gen des MR ist auf Chromosom 4 in der Region q31.1 lokalisiert und besteht beim Menschen aus 10 Exons<sup>(9;10)</sup>. Die ersten beiden Exons 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  werden nicht translatiert, sondern beeinflussen die Transkriptstabilität und die Translationseffizienz. Die 5'-Regionen der Exons 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  entsprechen zwei unterschiedlichen Promotoren des MR P1 und P2. Der proximale P1-Promotor ist stärker wirksam und ist in Aldosteronzielgeweben wie Niere, Kolon, Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Fettgewebe und den Geweben des Reproduktionstraktes aktiv, während der P2-Promotor schwächer ist und nur in bestimmten Entwicklungsphasen oder physiologischen Situationen eine Rolle spielt<sup>(11;12)</sup>. Als mRNA existiert daher ein hMR $\alpha$  und ein hMR $\beta$ . Da die Translationsinitionsstelle 2 bp stromabwärts im Exon 2 liegt, entsteht immer dasselbe 107 kDa Translationsprodukt. Bei diesem kodiert Exon 2 die N-terminale Domäne, während die Exon 3 und 4 für je einen Zinkfinger der DNA-bindenden Domäne und die Exons 5-9 für die Scharnierregion und die ligandenbindende Domäne des MR verantwortlich sind (s. Abb. 1). Es sind verschiedene Splicevarianten mit noch unklarer Bedeutung bekannt<sup>(13;14)</sup>.

### 1.1.2. Protein

Wie alle nukleären Rezeptoren besitzt der MR vier funktionelle Domänen<sup>(3)</sup>.

Die N-terminale Domäne (NTD) des MR ist mit 602 Aminosäuren die längste NTD aller Steroidrezeptoren und besitzt zwei Transaktivierungsdomänen AF-1a (activating function-1a; 1-167 aa) und AF-1b (445-602 aa) mit einer dazwischenliegenden inhibitorischen Domäne (163-437 aa). Die Beiträge von AF-1 und AF-2 zur Gesamttransaktivierungsaktivität des MR hängen stark vom zellulären und Promotorkontext ab. Insgesamt scheint AF-1 für etwa 40-50% der Transaktivierungsaktivität verantwortlich zu sein. Zusätzlich besitzt die NTD ein serin-threoninreiches NLS0 (nuclear localization signal)<sup>(15)</sup>. Da sich GR und MR in der NTD am stärksten voneinander unterscheiden, wird dieser Region eine Schlüsselrolle bei der MR-Spezifität zugeschrieben. Alternativ wird sie auch als A/B-Domäne bezeichnet<sup>(16;17)</sup>.

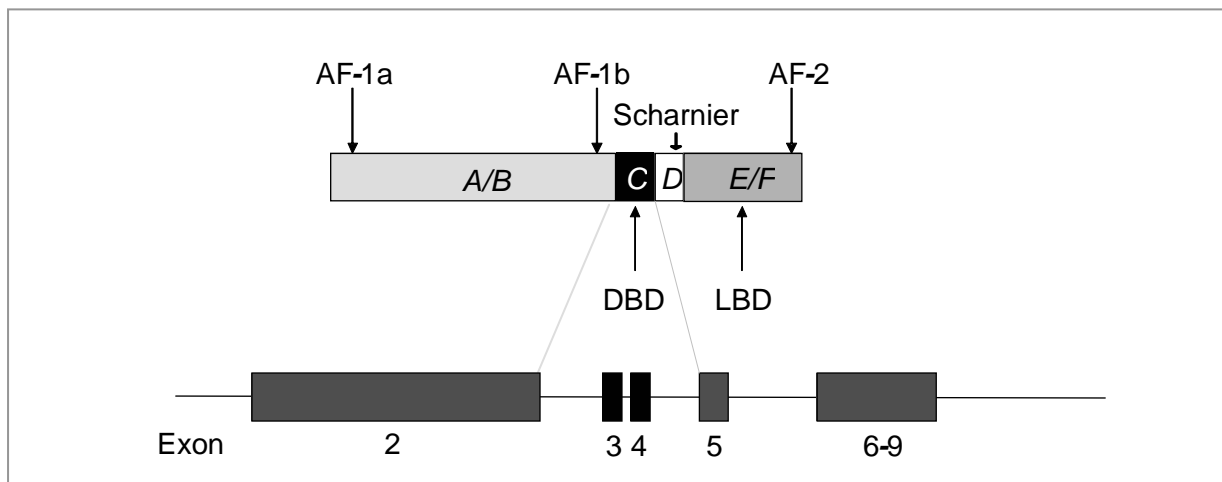
Die DNA-bindende Domäne (DBD) besteht aus zwei Zinkfingerdomänen für die Bindung an das HRE (hormone response element) der DNA. Soweit bisher bekannt, teilen sich GR und MR ein HRE, das sogenannte GRE (glucocorticoid response element). Die DBD ist stark konserviert mit einer Homologie von 90% zwischen den Steroidrezeptoren. Sie beinhaltet neben einer P-Box für die Interaktion mit einem halben GRE eine D-Box für eine schwache Dimerisierung, sowie ein Kernexportsignal zwischen den Zinkfingern. Die DBD wird auch als C-Domäne bezeichnet<sup>(18-20)</sup>.

Die Scharnierregion oder D-Domäne (Aminosäure 671-732) enthält eine prolinreiche Region, die eine Richtungsänderung der DBD relativ zur Ligandenbindungsdomäne bewirkt. Hierdurch kann die allgemeine Transkriptionsmaschinerie durch den Rezeptor aktiviert werden. Die Scharnierregion besitzt ein schwaches nukleäres Lokalisationssignal NLS1. Außerdem ist diese Region an der Rezeptorhomodimerisierung beteiligt, wie dies auch für den GR bekannt ist<sup>(18;21)</sup>.

Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) besteht aus 251 Aminosäuren (ca. 60% Homologie zu anderen Steroidrezeptoren). Aufgrund bereits kristallisierter LBDs anderer Steroidrezeptoren nimmt man an, dass die LBD des MR aus 12 $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -Faltblatt, die drei antiparallele Schichten bilden, besteht<sup>(22-28)</sup>. In Abwesenheit eines Liganden bildet die LBD diverse Kontaktstellen zu Chaperonen, wie den Hitzeschockproteinen 70 und 90, sowie zu verschiedenen Immunophilinen<sup>(26;29;30)</sup>. Diese werden bei Ligandenbindung freigesetzt und geben das Kernlokalisierungssignal 2 (NLS2) frei, das für die Translokation des aktiven Rezeptors von Bedeutung ist<sup>(31;32)</sup>. Außerdem besitzt die LBD Kontaktflächen für eine Heterodimerisierung mit dem GR und eine ligandenabhängige AF-2-aktivierende-Funktion<sup>(33)</sup>. In der Helix12 liegen 30 Aminosäuren, die für die Aktivierung der Transkription

genügen, d.h. die Transkriptionsmaschinerie rekrutieren können. Nach Ligandenbindung an eine hydrophobe Tasche bestehend aus den Helices H3, H4, H5 und H12 rotiert die Helix H12 und verdeckt die Bindungstasche. Gleichzeitig verändern die Helices H3, H5 und H11 ihre Position und bilden eine hydrophobe Spalte, die mit der NR-Box von Koaktivatoren interagieren kann (LXXLL Motiv).

Vom MR existieren mindestens zwei Proteinvarianten MRA und MRB, die durch alternative Translation entstehen und unterschiedliche Transaktivierungsaktivitäten zeigen<sup>(34)</sup>. Hierdurch könnte eine Feinregulierung der MR-Transkriptionsaktivität und der daraus resultierenden Genexpression erfolgen. Allerdings wurden diese Varianten bisher nur in vitro hergestellt.



**Abb. 1**

Einteilung des humanen Mineralocorticoidrezeptors in vier Regionen: die A/B- oder N-terminale Domäne mit den Transaktivierungsdomänen AF-1a und AF-1b, die DNA-bindende Domäne (DBD) C, die Scharnierregion D und die ligandenbindende Domäne (LBD) E/F mit zusätzlicher Transaktivierungsdomäne AF-2. Darunter Darstellung der dazugehörigen Exons.

### 1.1.3. Posttranslationale Modifikationen

Über die posttranslationalen Modifikationen des MR gibt es nur wenige Daten, so dass Rückschlüsse von Untersuchungen an anderen Steroidrezeptoren gezogen werden müssen. Bisher am besten untersucht wurde die Phosphorylierung des MR, wobei sich die Ergebnisse allerdings z.T. widersprechen. So wurde von LeMoellic et al. gezeigt, dass eine Phosphorylierung von bestimmten Serin- und Threoninresten durch PKC $\alpha$  zu einer Stimulierung der Transaktivierungsaktivität des MR führt, während Lim-Tio et al. durch PKC-Stimulation keine Veränderung der MR-Transaktivierung nachweisen konnten<sup>(35;36)</sup>. Ferner soll es durch PKA zu einer NTD-abhängigen Aktivierung des MR kommen, allerdings eher durch Phosphorylierung von Koregulatoren als durch eine direkte Phosphorylierung des

Rezeptors<sup>(37)</sup>. Bei Brown-Norway-Ratten existiert eine Y73C-Mutation, die eine verstärkte Transaktivierung des MR durch Aldosteron und Progesteron bedingt und die Tiere unempfindlich für Adrenalectomien macht. Sie wird als mögliche Phosphorylierungsstelle mit Einfluß auf die MR-Aktivität angesehen, wobei aber bisher keine direkte Phosphorylierung nachgewiesen wurde<sup>(38;39)</sup>. Außer Phosphorylierungen wurden auch noch weitere Modifikationen untersucht. Mit Hilfe von PEST-Algorithmen konnten beim MR zwei putative Lysinreste für eine Ubiquitinierung (K367 (NTD) und K715 (Scharnierregion)) sowie vier stark konservierte Sumoylierungs-Konsensussequenzen in der NTD (K89, K399, K428, K494) und eine in der LBD (K953)) identifiziert werden. Auch eine Transrepression durch Neddylierung und Acetylierung wird vermutet<sup>(18)</sup>.

#### **1.1.4. Koaktivatoren und Korepressoren des MR**

Bei den Koaktivatoren und Korepressoren des MR wird zwischen allgemeinen und MR-spezifischen Koregulatoren unterschieden.

Die Mitglieder der SRC-1-, SRC-2- und SRC-3-Familie gehören zu den allgemeinen Koaktivatoren, die von verschiedenen Steroidrezeptoren genutzt werden<sup>(40)</sup>. Durch Interaktion von DNA-gebundenen Steroidrezeptoren mit SRC-1 kommt es zur sequenziellen Rekrutierung von weiteren Faktoren, die den Präinitiationkomplex bilden, der für die Transkription notwendig ist. Hieran ist besonders die AF-2-Domäne (activating function-2) der LBD des MR beteiligt<sup>(16;41)</sup>.

Für einige Koaktivatoren wird zumindest eine gewisse MR-Spezifität angenommen. So rekrutiert die RNA-Helikase RHA (RNA/nuclear DNA helicase II) CBP/p300 durch die AF-1a-Domäne des MR und interagiert an dsDNA mit Topoisomerase II $\alpha$  und Ubc9, was zur DNA-Relaxation führt. Bisher ist keine Interaktion von RHA mit weiteren Steroidrezeptoren bekannt<sup>(42;43)</sup>. Auch Fas-associated factor 1, ein schwacher Koaktivator für den MR, soll keinen Effekt auf andere Steroidrezeptoren haben. Allerdings wurde dieser Faktor bisher nur in einer Nervenzelllinie nachgewiesen<sup>(44)</sup>. ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) ist ein selektiver MR-Koaktivator, der direkt mit der NTD des MR interagiert und dessen Koaktivierung AF-1b-abhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass ELL die RNA-Polymerase-II-Prozessivität und Elongationsrate erhöht. Gleichzeitig führt ELL zu einer Hemmung der Glucocorticoidrezeptor-Transaktivierung und hat keinen Einfluß auf die Transaktivierung des Androgen- oder Progesteronrezeptors<sup>(45)</sup>.

Zu den allgemeine Korepressoren von nukleären Rezeptoren zählen NcoR (nuclear receptor corepressor) und SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor),



zwei Paraloge, die konstitutiv an ihre response elements auf Ziel promotoren gebunden sind. Sie docken mit ihren multiplen CoRNR Motiven (I/LXXI/VI) an die hydrophobe Spalte der freien LBD an, woraufhin Histondeazetylasen rekrutiert werden und die Genexpression hemmen. Da der MR ohne Ligand hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist, hat dieser Mechanismus für ihn hauptsächlich bei Vorhandensein von MR-Antagonisten eine Bedeutung. Es wird angenommen, dass bei Bindung von Antimineralocorticoiden und anschließender Translokation in den Kern die Genexpression durch Korepressoren gehemmt wird<sup>(18)</sup>. Für die meisten Steroidrezeptoren wurde außerdem eine Interaktion mit der PIAS-Proteinfamilie (protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription) gezeigt. PIAS1 soll z.B. ein spezifischer Korepressor für den MR ohne Effekt auf die GR-Transaktivierung sein<sup>(17)</sup>.

### **1.1.5. Mineralocorticoid-Selektivität**

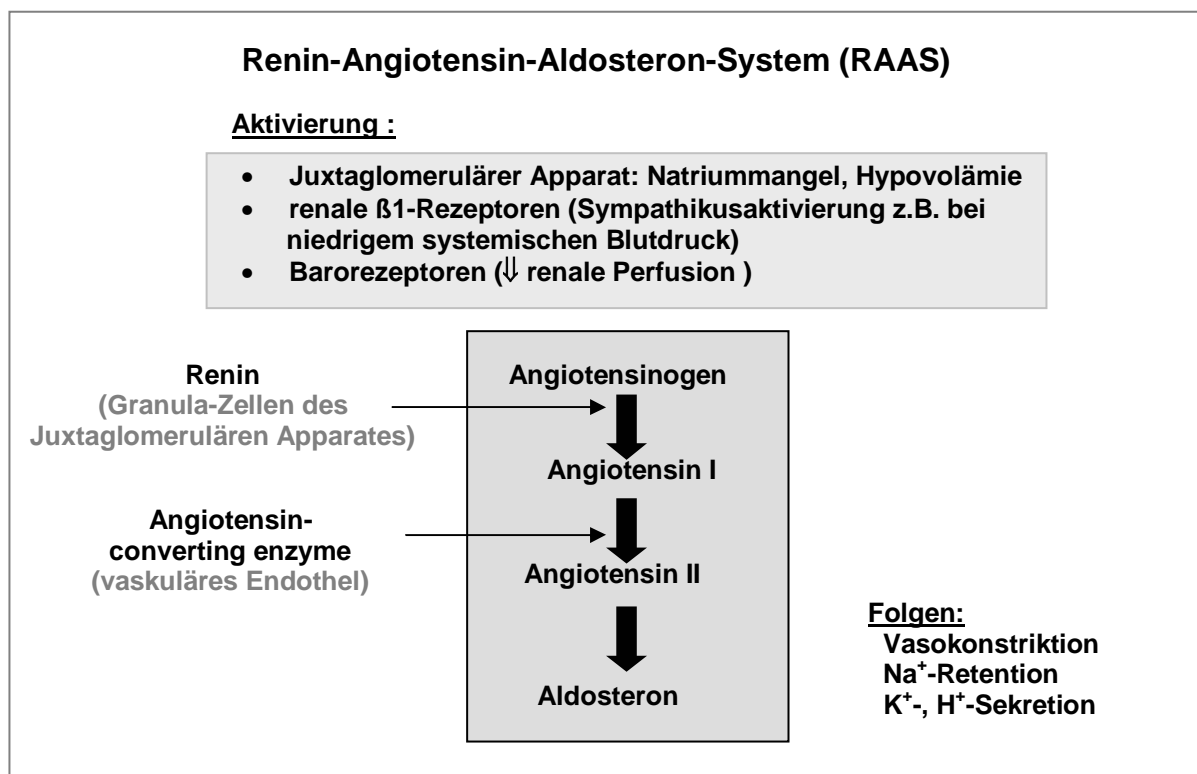
Glucocorticoide binden mit ähnlicher Affinität an den MR wie Aldosteron und kommen außerdem in 100-1000fach höheren Plasmakonzentrationen vor, so dass der hMR überwiegend Cortisol gebunden haben sollte, selbst unter Berücksichtigung der höheren Plasmaproteinbindung von Cortisol<sup>(6;46)</sup>. Im Gegensatz zu den Glucocorticoiden zeigt Aldosteron eine klare Rezeptorselektivität und bindet in physiologischen Konzentrationen nur an den MR und nicht an den GR. Wie es unter diesen Bedingungen zu mineralocorticoidspezifischen Effekten am MR kommen kann, ist noch nicht abschließend geklärt.

Auf der Prärezeptorebene sind die Gewebeverteilung und das Expressionsniveau des MR und seiner (spezifischen) Koregulatoren (s. 1.1.4.) entscheidend für die MR-vermittelte Aldosteronsensitivität bestimmter Zelltypen. Zusätzlich kommt der 11 $\beta$ -HSD-2 (11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-2) eine besondere Bedeutung bei der Herstellung der Selektivität zu, da sie durch Umwandlung von Cortisol in inaktives Cortison den MR vor dem Einfluß von Glucocorticoiden schützt<sup>(47)</sup>. Mutationen der 11 $\beta$ -HSD-2 führen zu schwerer Hypertonie mit apparentem Mineralocorticoidexzess (AME)<sup>(48;49)</sup>, weil es durch Glucocorticoide zu einer Daueraktivierung des ungeschützten MR kommt. Hohe Konzentrationen an NADH, wie sie durch 11 $\beta$ -HSD-2 entstehen, sollen MR-Glucocorticoid-Komplexe inaktivieren. Die Aktivierung wäre also vom Redoxzustand der Zelle abhängig<sup>(50)</sup>. Allerdings wird die 11 $\beta$ -HSD-2 hauptsächlich in klassischen epithelialen MR-Geweben exprimiert und nur in geringen Konzentrationen im Herzen oder ZNS<sup>(51-55)</sup>. Daher müssen weitere molekulare Mechanismen die Rezeptorspezifität bewirken.

Am Rezeptor selbst entstehen je nach Ligandenbindung verschiedene Konformationsänderungen, die zu Unterschieden in der Transaktivierung und Kofaktorrekutierung führen. Zusätzlich weisen Aldosteron und Cortisol trotz ähnlicher Affinitäten unterschiedliche Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) am MR auf. Aldosteron dissoziiert wesentlich langsamer ab und kann die H12-Helix wesentlich effizienter in der aktiven Position stabilisieren als Glucocorticoide<sup>(56)</sup>. In Anwesenheit von Aldosteron sind N-C-terminale Interaktionen des MR stark ausgeprägt, während Cortisol diese eher hemmt. Solche intramolekulare Kontakte könnten ligandenabhängig die Rekrutierung von Koregulatoren stimulieren<sup>(43;57)</sup>. Die NTDs der verschiedenen Steroidrezeptoren sind aufgrund ihrer Variabilität Schlüsselemente für Interaktionen mit spezifischen Koregulatoren und damit für die Spezifität von Steroidrezeptoren.

### 1.1.6. Endogener Ligand Aldosteron

Aldosteron, ein Steroidhormon mit Hemiazetalform, ist der natürliche Ligand vom MR beim Menschen. Es ist Teil einer Hormon-Kaskade, dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das an der Regulation des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes und an der Blutdruckregulation beteiligt ist. Eine Stimulation der Aldosteronsynthese erfolgt durch Angiotensin II, erhöhte  $K^+$ -Ionenkonzentration im Plasma und durch ACTH (s. Abb. 2).



**Abb. 2**

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System: Regulation des Wasser-Elektrolythaushaltes und des Blutdruckes.

Klassischerweise wird Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebenniere gebildet. Die Synthese erfolgt aus Cholesterin durch diverse Enzyme, die z.T. in den Mitochondrien und z.T. im glatten endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Die Existenz von lokalen Renin-Angiotensin-Systemen wurde in verschiedenen Geweben postuliert und besonders in Geweben mit nicht-klassischen Aldostereffekten untersucht<sup>(58)</sup>. So wurden mRNA-Transkripte für die Enzyme (CYP11A1, 3 $\beta$ -HSD, CYP21A, Aldosteronsynthase) und Kofaktoren (StAR, Adrenodoxin) der Aldosteronbiosynthese in den Endothel- und glatten Muskelzellen verschiedener Gefäße nachgewiesen<sup>(59-62)</sup>. Eine lokale Aldosteronsynthese in der Gefäßwand könnte an der Entstehung von Bluthochdruck beteiligt sein. Hierfür spricht, dass genetisch hypertensive stroke-prone-sponaneously-hypertensive rats (SHRSP) im Vergleich zu normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) in der Aorta eine höhere Aldosteronsynthase-Expression aufweisen<sup>(63)</sup>. Auch in Rattenherzen wurden alle Enzymtranskripte für die Aldosteronsynthese gefunden; beim Menschen war die Aldosteronsynthase allerdings nur im fetalen Herzen nachweisbar<sup>(51;64)</sup>. Ein Anstieg der Aldosteronsynthase-Expression bei Herzversagen sowie eine Korrelation zwischen der mRNA-Höhe und dem Kollagengehalt des Herzens wurde festgestellt<sup>(65;66)</sup>. Über die Höhe der myokardialen Aldosteronkonzentration gibt es stark widersprüchliche Angaben<sup>(64;67)</sup>. Für das kardiale Remodeling scheint aber primär die adrenale und nicht die lokale Aldosteronproduktion von Bedeutung zu sein, da es durch Adrenalectomie in verschiedenen Tiermodellen verhindert werden konnte<sup>(68;69)</sup>. Auch in verschiedenen ZNS-Gebieten wurden Transkripte für die Aldosteronsynthese meist in Kolokalisation mit dem MR nachgewiesen, so dass eine auto- oder parakrine Wirkung angenommen wird. Da insgesamt die Höhe der Genexpression in lokalen RAAS wesentlich niedriger ist als in der Nebenniere und teilweise nahe der Nachweisgrenze liegt, ist die Bedeutung der lokalen RAAS unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen noch unklar.

#### **1.1.7. Funktionsweise des MR**

Der MR wird ohne Ligandenbindung im Zytosol durch einen Komplex aus Hsp90, Hsp70 und Immunophilinen (FKBP4) in einer aktivierbaren Konformation gehalten<sup>(70;71)</sup>. Die Aktivierung durch Bindung eines Liganden führt zur Abdissoziierung der Chaperone und zur Dimerisierung der Rezeptoren mit anschließender Translokation in den Zellkern, wo der MR als Homodimer an HRE von Zielgenen bindet und diese aktiviert oder hemmt<sup>(3;72;73)</sup>. Es ist auch möglich, dass Heterodimere gebildet werden, insbesondere mit dem GR<sup>(74)</sup>. Zusätzlich kann Aldosteron nicht-genotrope Effekte bewirken. Ob diese Effekte nur über den MR oder

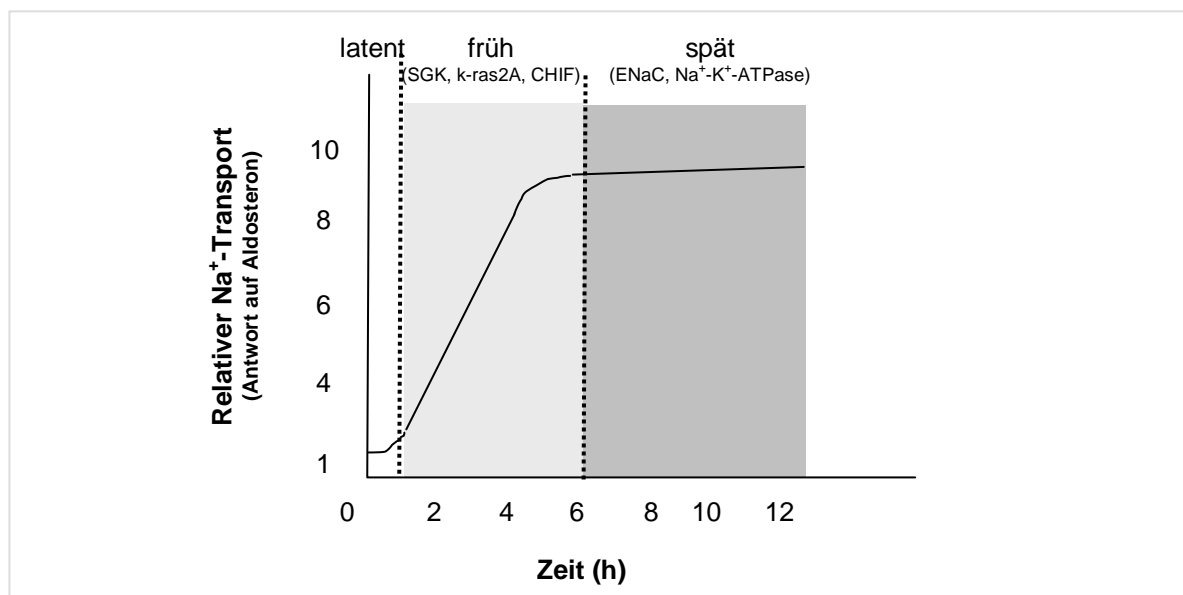
auch über zusätzliche Rezeptoren vermittelt werden, ist noch nicht abschließend geklärt, da einige Effekte nicht durch Cortisol ausgelöst und auch nicht durch den MR-Antagonisten Spironolaktone gehemmt werden können.

### 1.1.8. Wirkungen von Aldosteron/MR

#### 1.1.8.1. Epitheliale genomische Effekte

Klassische MR-Zielgewebe sind die polaren Epithelien von Niere, Kolon, Schweiß- und Speicheldrüsen, in denen der MR den gerichteten Natriumtransport vermittelt, dem Wasser folgt<sup>(75-78)</sup>. Andere epitheliale Gewebe mit Transportfunktion wie Lungen-, Mamma- und Dünndarmepithelien exprimieren den MR in niedrigeren Konzentrationen<sup>(79-82)</sup>.

Insgesamt kommt es durch Aldosteron zu einer vermehrten epithelialen Natriumresorption. Hieran sind apikal ein Natriumkanal (ENaC) und basolateral eine energieverbrauchende Natriumpumpe ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase) beteiligt, wobei der apikale Schritt der limitierende ist<sup>(83-85)</sup>. Die zwei Möglichkeiten von Aldosteron den Natriumtransport zu fördern sind eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des ENaC oder eine Erhöhung der Anzahl der Kanäle in der apikalen Membran. Da es Hinweise für beides gibt, könnte auch eine Kombination aus beidem für einen erhöhten Natriumtransport durch Aldosteron sorgen<sup>(86;87)</sup>. Andere Proteine, die durch Aldosteron beeinflusst werden, sind der luminale  $\text{Na}^+$ -Protonen-Austauscher (NHE3) und der thiazid-sensitive  $\text{Na}^+$ - $\text{Cl}^-$ -Kotransporter des distalen Tubulus<sup>(88-92)</sup>.



**Abb. 3**

Die verschiedenen Phasen des Aldosteron-induzierten Natriumtransportes (SGK = serum glucocorticoid-regulated kinase, k-ras2A = kirsten ras GTP-binding protein 2A, CHIF = channel-inducing factor, ENaC = epithelial  $\text{Na}^+$ -channel)<sup>(93)</sup>.

Aldosteron führt vor Veränderung der Expression von Kanälen und Transportern zu einer gesteigerten Natriumresorption, so dass die Aldosteronwirkung in eine latente, eine frühe (1-6 h) und eine späte (> 6 h) Phase eingeteilt wird. Die Effekte der frühen Phase entstehen durch Induktion von Signalproteinen, die zur posttranslationalen Aktivierung von bereits existierenden Kanälen und Transportproteinen führen. Der genaue Mechanismus mit allen beteiligten induzierten oder reprimierten Proteinen ist nicht vollständig geklärt. Folgende Proteine können durch Aldosteron-gebundenen MR induziert werden:

### ENaC

ENaC (epithelial  $\text{Na}^+$ -channel) besteht aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , deren Stöchiometrie in der Membran noch unklar ist. In der Niere kommt es bei Aldosteronstimulation zu einem Anstieg der mRNA der  $\alpha$ -ENaC-Untereinheit, während im Kolon die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Untereinheiten vermehrt transkribiert werden<sup>(94-96)</sup>. Aktivierende Mutationen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit führen zum Liddle-Syndrom (Pseudohyperaldosteronismus), inaktivierende Mutationen dagegen zum Pseudohypoaldosteronismus (PHA-1)<sup>(97-100)</sup>. ENaC befindet sich in intrazellulären Kompartimenten und der Plasmamembran. Der Abbau apikal eingebauter Moleküle durch das Proteasom wird durch die Ubiquitinligase Nedd4-2 eingeleitet, die durch die SGK-1 phosphoryliert und damit gehemmt wird<sup>(101)</sup>. Eine direkte Interaktion der PY-Region der SGK mit der ww-Domäne von Nedd4-2 wird postuliert<sup>(102)</sup>. Da SGK-1 durch Aldosteron vermehrt exprimiert wird, kommt es durch Aldosteron zu einem verminderten Abbau des ENaC<sup>(103)</sup>. Gleichzeitig kommt es auch durch direkte Phosphorylierung des ENaC durch SGK1 zu einer gesteigerten ENaC-Aktivität. Weitere Moleküle, über die Aldosteron zu einer gesteigerten ENaC-Aktivität führen soll, sind CAP-1 (channel activating protease) und eine noch nicht näher charakterisierte Methyltransferase der  $\beta$ -Untereinheit des ENaC<sup>(101;104-107)</sup>.

### CHIF

CHIF (Channel-inducing factor) gehört zur FXYD-Familie kleiner Transmembranmoleküle, wie auch die  $\gamma$ -Untereinheit der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase<sup>(108)</sup>. Besonders im distalen Kolon und im Sammelrohr der Niere wurden hohe Konzentrationen nachgewiesen<sup>(109)</sup>. Neben einer natrium- und kaliumkonzentrationsabhängigen Regulation wurde im distalen Rattenkolon eine vermehrte Expression durch Corticosteroide gezeigt<sup>(110)</sup>. CHIF-knock-out-Mäuse zeigen primär keinen Phänotyp, versterben aber im Gegensatz zu Kontrolltieren nach Kaliumbelastung mit gleichzeitiger Furosemidgabe<sup>(111)</sup>. Es wird angenommen, dass CHIF die Affinität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase für Natrium erhöht<sup>(112)</sup>.

### SGK-1

SGK-1 (serum glucocorticoid-regulated kinase 1) ist eine Serin-Threonin-Kinase, deren mRNA- und Proteinkonzentration innerhalb von 15-30 min nach Aldosterongabe ansteigt mit einem Maximum nach 1-2 h<sup>(113;114)</sup>. SGK-knock-out-Mäuse (SGK-1) fallen nach Salzrestriktion durch eine leicht reduzierte Aldosteronsensitivität mit Hyperkaliämie und Salzverlust auf<sup>(115;116)</sup>. SGK phosphoryliert und inaktiviert u.a. die Ubiquitinligase Nedd4-2, die den ENaC ubiquitiniert und damit dem proteasomalen Abbau zuführt<sup>(117-119)</sup>. Es kommt dadurch zu einer verlängerten Halbwertszeit des ENaC. Zusätzlich scheint die SGK auch die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase<sup>(120-122)</sup>, des Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Kotransporter (NKCC2; BSC1)<sup>(123-125)</sup> und des K<sup>+</sup>-Kanals ROMK<sup>(116;126;127)</sup> zu erhöhen.

### K-ras2A

K-ras2A (Kirsten Ras GTP-binding Protein 2A) ist ein kleines monomeres G-Protein, das in der frühen Phase der Aldosteronaktion induziert wird<sup>(128;129)</sup>. Es handelt sich um eine Splicevariante des K-Ras2 mit einem c-terminal lysinreichen Abschnitt. K-Ras2A ist für den Natriumtransport in Kolon- und Nierenepithelzellen von Bedeutung, vermutlich über eine vermehrte Offenwahrscheinlichkeit des ENaC; allerdings wurde gleichzeitig eine verminderte Oberflächenexpression von ENaC beobachtet<sup>(130;131)</sup>. Die Steigerung der ENaC-Aktivität soll PI3-Kinasen-vermittelt sein<sup>(132;133)</sup>.

### GILZ

GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper protein) ist ein bekanntes Glucocorticoid-response-Gen in T-Zellen, das die Raf-1-Phosphorylierung hemmt, wodurch die MAP-Kinasen-Signalkaskade unterbrochen wird<sup>(134)</sup>. Neuere Untersuchungen zeigen, dass GILZ durch negative Regulation der tonischen ENaC Hemmung zu einer vermehrten Natriumabsorption in Epithelien führt und so an der Aldosteronwirkung auf den Elektrolythaushalt beteiligt ist<sup>(135-137)</sup>.

### NDRG2

NDRG2 (N-myc downstream-regulated gene 2) wird durch Aldosteron, nicht aber durch Glucocorticoide induziert. Neben einer starken Expression im Gehirn kann NDRG2 besonders im Myokard und der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden sowie in Niere, Nebenniere und Kolon<sup>(138;139)</sup>. Die Funktion ist noch weitgehend unklar. Interessanterweise ist NDRG2 homolog zu Drosophila-MESK2, einem Bestandteil der Ras-Kaskade<sup>(139)</sup>. Außerdem wurde NDRG2 als Substrat für die SGK-1 identifiziert<sup>(140)</sup>. Eine Hemmung der Phosphorylierung durch Androgene und eine Steigerung durch Insulin sind bekannt<sup>(141;142)</sup>.

### Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

Die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wird durch die intrazelluläre Natrium- und Magnesiumkonzentration und durch die Verfügbarkeit von ATP beeinflusst. Außerdem spielt der Einbau der Untereinheiten in die basolaterale Membran eine Rolle sowie kleine transmembranäre Modulatoren wie die  $\gamma$ -Untereinheit, die die Affinität der Pumpe für Natriumionen beeinflusst. Durch Aldosteron nimmt die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität in der frühen Phase der Aldosteronwirkung durch eine Steigerung der Natriumffinität und/oder eine vermehrte Rekrutierung intrazellulärer Pumpen zu<sup>(143-145)</sup>. Erst in der späten Phase der Aldosteronwirkung kommt es zu einer vermehrten MR-vermittelten Expression der  $\alpha$ 1- und eventuell auch der  $\beta$ 1- Untereinheit<sup>(83;85;146-149)</sup>.

### PI3-Kinase

Die Aktivität der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) wird durch Aldosteron, Insulin und Vasopressin in der Niere stimuliert, wobei die PI3-Kinase nicht als direkt Aldosteron-induziertes Molekül gilt<sup>(150;151)</sup>. Es wird vermutet, dass die PI3-Kinase eine Schaltstelle für die Integration der Signalwege dieser drei Hormone ist, die zu einer Regulation von ENaC und Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase führt<sup>(93;152)</sup>.

SGK, ki-Ras und PI3-Kinase sind an Kaskaden zur Kontrolle von Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung beteiligt. Allgemein führt Aldosteron zu einer vermehrten Differenzierung von Epithelien in einen Na<sup>+</sup>-reabsorbierenden Phänotyp. Außerdem fördert der MR die Differenzierung von braunem Fettgewebe. Alle bisher identifizierten Aldosteron-induzierten Gene außer NDRG2 sind auch durch Cortisol regulierbar, so dass die Spezifität der Aldosteronwirkung hierdurch nicht erklärbar ist. Im SGK-Promotor und den  $\alpha$ 1- bzw.  $\beta$ 1-Untereinheiten der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase wurden GREs gefunden<sup>(153-158)</sup>; ein spezifisches HRE für den MR wurde bisher nicht identifiziert.

#### **1.1.8.2. Nicht-epitheliale Effekte von Aldosteron**

Auch in nicht-epithelialen Geweben, besonders im kardiovaskulären System und im ZNS, wurde der MR nachgewiesen. Im ZNS scheint er an der Regulierung von Blutdruck, Salzappetit und Sympthikotonus beteiligt zu sein, während ihm im Herz-Kreislauf-System eine pathophysiologische Rolle bei der Entstehung von Hypertrophie, Fibrose und endothelialer Dysfunktion zugeschrieben wird.

Im kardiovaskulären System wurde der MR in Kardiomyozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und im Endokard nachgewiesen<sup>(51;52)</sup>. Auch 11 $\beta$ -HSD-Isoenzyme-1- und -2-

Expression wurde im kardiovaskulären System gefunden, allerdings nur in niedrigen Konzentrationen<sup>(159;160)</sup>.

Am Herzen verursachen erhöhte Aldosteronkonzentrationen im Tiermodell eine perivaskuläre und interstitielle Fibrose sowie eine Herzhypertrophie, und zwar unabhängig von den Blutdruckwerten<sup>(161-163)</sup>. Auch beim Menschen sind linksventrikuläre Hypertrophien und Schlaganfälle bei Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus häufiger als in Vergleichskollektiven mit ähnlichen Blutdruckwerten<sup>(164-166)</sup>. Die Antimineralocorticoide Spironolaktone oder Eplerenone führen in nicht-blutdrucksenkenden Dosen bei der Behandlung der linksventrikulären Dysfunktion zu einer Senkung der Morbidität und Mortalität in klinischen Studien (RALES, EPHEsus)<sup>(167;168)</sup>. Für Eplerenon gibt es sogar Hinweise, dass es eine Mineralocorticoid-induzierte Fibrose nicht nur verhindert sondern auch partiell rückgängig machen kann<sup>(169)</sup>. Die Mechanismen, die der pathophysiologischen Aldosteronwirkung am Herzen zugrunde liegen, sind noch weitgehend unklar. Histologisch kommt es bei der Aldosteron-induzierten Herzfibrose zu einer Proliferation der Kardiomyozyten und -fibroblasten und zu einer perivaskulären Entzündung. In einigen Tiermodellen wurden Veränderungen wie ansteigende Entzündungsmarker (TNF $\alpha$ , ED-1) und Kollagen-III-Ablagerungen bereits nach zwei Tagen beobachtet<sup>(170)</sup>. Ebenso konnte in Herzfibroblasten eine vermehrte Kollagen-I-Synthese durch Aldosteron induziert werden<sup>(171;172)</sup>. Auch über eine Erhöhung der Endothelin-Rezeptorzahl, die wiederum zu einer vermehrten Kollagensynthese führt, wird berichtet<sup>(173)</sup>. Allerdings gibt es auch Hinweise, dass die kardiale Schädigung primär durch entzündliche Veränderungen der versorgenden Gefäße zustande kommt, die zu einer Myokardischämie mit Nekrose und anschließender Fibrose führen<sup>(170;174)</sup>. Hierbei soll oxidativer Stress eine Rolle spielen<sup>(175)</sup>. Insgesamt wird die pathologische Wirkung von Aldosteron durch eine hohe Natriumaufnahme und Volumenbelastung begünstigt, ohne primär vom Blutdruck abzuhängen. Interessanterweise wirken MR-Antagonisten bzw. eine Adrenalectomie auch in anderen hypertensiven Tiermodellen wie der L-NAME-/AngII-Ratte protektiv auf das kardiovaskuläre System, obwohl diese keine Hyperaldosteronämie aufweisen<sup>(176)</sup>.

Die lokale Biosynthese von Aldosteron im Herzen scheint für die pathologische Wirkung des Hormons eher unbedeutend zu sein, da durch Adrenalectomie die Fibroseinduktion durch Natrium und Angiotensin II aufgehoben werden kann<sup>(68;177)</sup>. Aufgrund der höheren Glucocorticoid-Plasmakonzentration sind die Herz-MRs vermutlich ohnehin größtenteils durch Glucocorticoide besetzt, was durch 11 $\beta$ -HSD-1-Aktivität in Herzfibroblasten gefördert wird. Diese Glucocorticoide sollen an Kardiomyozyten eine MR-antagonistische Wirkung



besitzen. Passend dazu zeigen transgene Mäuse mit 11 $\beta$ -HSD-2-Überexpression Zeichen einer vermehrten MR-Aktivierung mit Herzhypertrophie, -fibrose und Herzversagen bei normaler Salzdiät<sup>(178)</sup>. Eine MR-Überexpression am Mauserzen führt dagegen zu einer dilatativen Kardiomyopathie bei normalen Blutdruckwerten<sup>(179)</sup>. In einem Knockdown durch MR-Antisense in kardialen Myozyten konnte eine Herzhypertrophie und -fibrose ausgelöst werden, die sich nach Spironolaktongabe verschlimmerte<sup>(180)</sup>. Diese Experimente stehen im Widerspruch zur MR-knock-out-Maus, die keinen kardialen Phänotyp besitzt<sup>(181)</sup>.

Durch erhöhte Aldosteronkonzentrationen wird zusätzlich ein Hypertonus ausgelöst. Außer durch Volumenbelastung und vaskuläres Remodeling könnte ein solcher Hypertonus durch direkten Einfluß auf den Gefäßtonus bedingt sein. So wurde für Aldosteron gezeigt, dass es die vasokonstriktorische Wirkung von Katecholaminen fördert, während es die vasodilatatorische Wirkung von Acetylcholin hemmt. Gleichzeitig ist bekannt, dass Spironolaktone AngII- oder fett-diätinduzierte endotheliale Dysfunktion, die vermutlich durch oxidativen Stress mit verminderter NO-Bioverfügbarkeit ausgelöst wird, reduzieren kann<sup>(182;183)</sup>. Aldosteron selbst soll endothelial eine Steigerung der NO-Freisetzung bewirken, die die vasokonstriktorische Wirkung an den glatten Muskelzellen moduliert<sup>(184;185)</sup>. Daher kann die vasokonstriktorische Wirkung von Aldosteron an Gefäßen durch Zerstörung des Endothels noch verstärkt werden. Außerdem ist eine direkte Wirkung von Aldosteron auf die NADPH-Oxidase mit vermehrter ROS-Produktion beschrieben.

Typische MR-Effekte im ZNS sind Blutdruckregulation, Stimulierung von Durst und Salzappetit, Modulation von Lernen und Gedächtnis sowie Steuerung der hypothalamisch-hypophysären Achse bei der zirkadianen Glucocorticoidsekretion<sup>(186-189)</sup>. Aldosteron kann die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren, wird aber vermutlich durch das Multidrug-Resistant-P-Glykoprotein wieder entfernt<sup>(190;191)</sup>. Der MR kommt im Gehirn hauptsächlich im Hippocampus, im Septum und den Körnerzellen des Kleinhirns vor<sup>(192)</sup>. Hohe 11 $\beta$ -HSD-2-Konzentrationen findet man bei Ratten im Subkommissuralorgan, dem Nucleus ventromedialis des Hypothalamus und in der Amygdala<sup>(193;194)</sup>. 11 $\beta$ -HSD-1 kommt im Gehirn verbreiteter vor und erhöht die Glucocorticoidwirkung am MR<sup>(193;195)</sup>.

Durch icv. (intracerebroventrikuläre) Aldosteroninjektionen in Dosen, die peripher den Blutdruck nicht beeinflussen, kann man einen Blutdruckanstieg unabhängig vom Natriumhaushalt auslösen<sup>(196;197)</sup>. Gleichzeitige icv. Infusion von Corticosteron oder dem MR-Antagonisten RU28318 schwächen den Blutdruckanstieg ab, so dass diese Effekte wahrscheinlich über den zentralen MR vermittelt werden. Zusätzlich können icv. RU28318-Infusionen Effekte eines systemischen Mineralocorticoid-Exzesses auf den Blutdruck, die

Baroreflexaktivität oder den Sympathikotonus aufheben<sup>(198;199)</sup>. Allerdings hat die Verhinderung des Bluthochdruckes durch icv. RU28318-Infusionen bei systemischem Aldosteronexzess keinen Einfluß auf die Entstehung einer kardialen Hypertrophie und Fibrose<sup>(200)</sup>. Insgesamt kommt es also bei zentraler oder peripherer Aldosteroninfusion über zentrale MRs zu einem Blutdruckanstieg, der durch MR-Antagonisten bzw. Glucocorticoide im ZNS gehemmt werden kann.

### **1.1.8.3. Nicht-genotrope Effekte von Aldosteron**

Dies sind Effekte des Aldosterons, die nicht durch Transkriptions- (Actinomycin) oder Translationshemmer (Cycloheximid) beeinflusst werden und innerhalb kürzester Zeit entstehen<sup>(201-204)</sup>. Primär kommt es nicht zu genomischen Effekten, allerdings können diese sekundär durch Aktivitätsänderung von Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden. Daher wird hier auch die Bezeichnung nicht-genotrop im Gegensatz zu nicht-genomisch gewählt, in Anlehnung an die von Manolagas für schnelle Effekte von Östrogenrezeptoren eingeführte Nomenklatur<sup>(205)</sup>. Auf drei Gebieten wird besonders intensiv geforscht: (1) putative neue Rezeptoren, (2) beteiligte Second-Messenger-Systeme und (3) Effektoren<sup>(93)</sup>.

Die Frage, ob nicht-genotrope Aldosteroneffekte MR-vermittelt sind oder nicht, wird noch widersprüchlich diskutiert. In einigen Studien wurde die Bedeutung des MR für nicht-genotrope Effekte durch Hemmung mit MR-Antagonisten wie Spironolakton oder Eplerenon gezeigt (Wirkung auf NHE, intrazelluläre Calciumkonzentration, Vasokonstriktion mesenterialer Widerstandsgefäße)<sup>(160;184;206)</sup>. Auf der anderen Seite waren die gleichen Antagonisten bei anderen Studien unwirksam. Schnelle Aldosteroneffekte auf die intrazelluläre Calciumkonzentration existieren auch in Zellen ohne klassischen MR und in Hautfibroblasten von MR-knock-out-Mäusen<sup>(207)</sup>. Auch in kernlosen Erythrozyten wurden sie bereits nachgewiesen<sup>(208)</sup>. Es wird daher die Existenz eines membranären, glucocorticoidinsensitiven Aldosteronrezeptors postuliert, der allerdings noch nicht eindeutig nachgewiesen oder gar kloniert wurde<sup>(209;210)</sup>. Solche Rezeptoren sind für den Progesteron- und den Östrogenrezeptor bereits charakterisiert worden<sup>(211-213)</sup>.

Die nicht-genotrope Signaltransduktion und die daraus resultierenden Effekte variieren von Zelltyp zu Zelltyp<sup>(214-220)</sup>. In glatten Gefäßmuskelzellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Aldosteron am Endothel über eine Aktivierung der PI3-Kinase zu einer Freisetzung von NO und damit Vasodilatation führt. Auf die darunter liegende glatte Gefäßmuskulatur hat Aldosteron dagegen eine proliferative und vasokonstriktive Wirkung,

die über die PI3-Kinase mit nachfolgender ERK1/2-Phosphorylierung vermittelt wird<sup>(184)</sup>. Die nicht-genotropen Effekte von Aldosteron sind also entscheidend an der Regulation des Vasotonus beteiligt. Ein weiteres Beispiel für nicht-genotrope Aldosteroneffekte ist die EGFR-vermittelte Aktivierung des ERK1/2-MAP-Kinasen-Weges in der Niere mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und Aktivierung des Natrium-Protonen-Austauschers. Als Folge kommt es zum Anschwellen der Zellen und zur Alkalisierung.

Auch in vivo lassen sich nicht-genotrope Effekte beobachten. So kann durch intraarterielle Infusion von Aldosteron der Blutfluß des Unterarms innerhalb von Minuten reduziert werden, wobei allerdings auch gegenteilige Effekte beschrieben wurden<sup>(221;222)</sup>. Außerdem wurde ein Anstieg des peripheren Gefäßwiderstandes und eine Abschwächung der Baroreflexsensitivität durch Aldosteron gezeigt<sup>(223-225)</sup>. An den efferenten Arteriolen der Niere kommt es durch nicht-genotrope Effekte zu einer Vasokonstriktion, die über PLC vermittelt wird und zu einem Druckanstieg in den Glomeruli führte, der die schädigende Wirkung von pathologischen Aldosteronkonzentrationen an der Niere bedingen könnte. Am Vas afferents ist die vasokonstriktive Wirkung von Aldosteron dagegen schwächer, lässt sich aber durch Schädigung des Endothels erheblich steigern<sup>(185;226;227)</sup>. Insgesamt gibt es eine Vielzahl von nicht-genotropen Effekten, die in der Literatur beschrieben sind, deren Relevanz aber meist noch nicht völlig geklärt ist.

## **1.2. Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)**

Der EGFR ist ein Zellmembranrezeptor, der zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) gehört. Die Rezeptortyrosinkinasen setzen sich aus einfach transmembranären Proteinen mit einer intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität zusammen und sind an der Regulation verschiedenster Zellfunktionen, wie Wachstum, Differenzierung, Zellmotilität oder Zellüberleben, beteiligt. Zur EGFR-Familie gehören neben dem EGFR, der auch als ErbB1 bezeichnet wird, noch drei weitere Mitglieder: HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 und HER4/ErbB4. Sie können untereinander Homo- oder Heterodimere bilden, wobei der EGFR meist Homodimere ausbildet, während die anderen Rezeptoren überwiegend als Heterodimere vorliegen. Als weitere Besonderheit besitzt HER2 keine Ligandenbindungsstelle und HER3 eine inaktive Kinasedomäne<sup>(228-230)</sup>. Die Bedeutung des EGFR wird auch durch Forschungsergebnisse in anderen Modellorganismen wie *Drosophila* und *C. elegans* unterstrichen, in denen Homologe des EGFR wesentlich an der Entwicklung beteiligt sind (z.B. Augenentwicklung bei *Drosophila* oder Vulvaentwicklung *C. elegans*)<sup>(231-233)</sup>.

Erwartungsgemäß sind daher EGFR-knock-out-Mäuse je nach genetischem Hintergrund maximal 2-3 Wochen nach der Geburt überlebensfähig bzw. sterben bereits vor der Implantation<sup>(234-238)</sup>. Eine Überexpression des EGFR wird bei verschiedenen Tumorerkrankungen beobachtet (s. Tab 1).

<b>Tumorart / Organ</b>	<b>EGFR-Überexpression (% der malignen Tumoren)</b>
Mamma	14-91
Blase	31-48
Colon	25-77
Gliom	40-50
Lunge NSCL	40-80
Pankreas	30-50
Ovar	35-70
Kopf / Hals	80-100

**Tab. 1**

EGFR-Überexpression in verschiedenen Tumorformen (meist durch Genamplifikation)<sup>(239-247)</sup>.

### 1.2.1. Gen

Der humane EGFR wird von Chromosomen 7 p12.3-p12.1 kodiert<sup>(248)</sup>. Das Gen ist fast 200 kDa lang und besitzt 28 Exons<sup>(249)</sup>. Exon 1 enthält eine 5'-UTR, sowie Sequenzen für ein Signalpeptid und die ersten fünf Aminosäuren des EGFRs. Exons 2-16 kodieren die extrazelluläre Domäne des Rezeptors, wobei die zwei cysteinreichen Regionen den Exons 5-7 und den Exons 13-16 entsprechen. Die kurze transmembranäre Domäne entsteht durch Translation des Exons 17. Der intrazelluläre Rezeptoranteil besteht aus der Tyrosinkinasedomäne (Exons 18-24) und der carboxyterminalen Region (Exons 25-28). Auffallend ist die extreme Länge des ersten Introns mit 123 kb und der relative Mangel an repetitiven Elementen; es wurden nur halb so viele SINE, LINE, LTRS und DNA Transposons gefunden wie rechnerisch erwartet. Insgesamt kommt es zu einem 5616 bp langen Transkript<sup>(250-252)</sup>.

### 1.2.2. Protein

Der EGFR ist ein 1210 Aminosäuren langes und 170 kDa schweres Molekül. N-terminal besitzt er eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, die aus 621 Aminosäuren besteht und

in vier Untereinheiten unterteilt wird. L1 (1-165 aa) und L2 (310-481 aa), auch Domäne I und III genannt, weisen eine hohe Homologie auf. L2 ist für die Ligandenbindung wesentlich, während L1 für die Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung bedeutend ist. Im Anschluß an die L1- und die L2-Domäne folgt jeweils eine cysteinreiche Region, S1 (166-309 aa) und S2 (482-621aa), die auch als Domäne II bzw. Domäne IV bezeichnet werden und auch noch extrazellulär liegen. Nachfolgend befindet sich eine einfache hydrophobe transmembranäre Region aus 23 Aminosäuren und ein intrazellulärer Teil mit einer hochkonservierten Tyrosinkinasedomäne (644-964aa), an die carboxyterminal eine Region mit mindestens drei Autophosphorylierungsstellen (Y1068, Y1148, Y1173) anschließt.

Neben dieser Maximalvariante, die auch als Isoform A oder 1 bezeichnet wird, sind beim Menschen drei trunkierte Isoformen beschrieben worden, die nur aus dem extrazellulären Anteil des EGFR bestehen (s. Tab. 2). Da sie bisher nur in humaner Plazenta bzw. in Karzinomzelllinien nachgewiesen wurden, ist ihre Bedeutung und Funktion noch unklar. Eventuell könnten sie an der Regulation der lokalen EGF-Konzentration durch Inaktivierung von EGF beteiligt sein<sup>(252-254)</sup>.

	<b>Transkript (bp)</b>	<b>Protein (aa)</b>	<b>NCBI #</b>
Isoform A	5616	1210	NM 005228
Isoform B	2239	628	NM 201282
Isoform C	1595	405	NM 201283
Isoform D	2864	705	NM 201284

**Tab. 2**

Isoformen des EGFR.

Zusätzlich wurden in Karzinomzellen aberrante Transkripte beschrieben, so z.B in humanen A431 Karzinomzellen ein 2,8 kb-Transkript durch genomisches Rearrangement bei Amplifikation des EGFR-Gens<sup>(250)</sup>.

### **1.2.3. Liganden**

Die meisten EGF-ähnlichen Liganden sind glykosylierte transmembranäre Präkursormoleküle, die durch proteolytische Spaltung von der Membran in reife Wachstumsfaktoren verwandelt werden (s. Tab. 3). Diesen Liganden gemeinsam ist eine EGF-Domäne mit sechs konservierten Cysteinresten, die in einem bestimmten Abstand

voneinander angeordnet sind und drei Disulfidbrücken bilden. Ligandenvermittelte Signaltransduktion muss über die hochaffine Bindung von EGF-ähnlichen Liganden an EGFR und HER4 oder über Neuregulinbindung an HER3 oder HER4 erfolgen. Es wird angenommen, dass Liganden bivalent sind und eine hoch- und eine niedrigaffine Bindungsstelle tragen, wodurch die EGF-induzierte EGFR-Homodimerisierung und die NRG-induzierte Heterodimerisierung mit HER2, der hauptsächlich durch die niedrigaffine Bindungsstelle gebunden wird, zustande kommt. Der orphan receptor HER2 ist der bevorzugte Heterodimerisierungspartner der EGFR-Familie. Er hemmt das Abdissoziieren von Liganden vom Heterodimer und führt so zu einer Verstärkung und Verlängerung der MAP-Kinasen-Aktivierung.

Liganden	Rezeptoren
EGF, Amphiregulin, TGF $\alpha$ , Epigen	EGFR
Betacellulin, HB-EGF, Epiregulin	EGFR, HER4
Neureguline 1, 2 (NRG 1, 2)	HER3, HER4
NRG3, 4	HER4

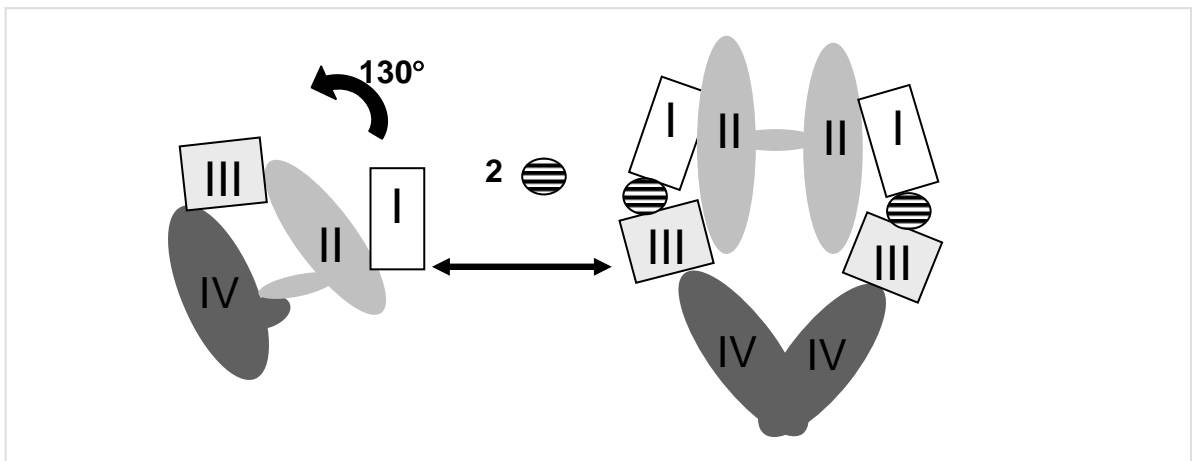
**Tab. 3**

Einteilung der Liganden der ErbB-Rezeptoren nach Rezeptoraffinität.

## 1.2.4. Funktionsweise des EGFR

### 1.2.4.1. Aktivierung

Im inaktiven Zustand ohne Ligand bindet Domäne II des extrazellulären Anteils an Domäne IV. Hierdurch wird die für die Dimerisierung wichtige Verbindungsregion bestehend aus den Aminosäuren 242-259 verdeckt und es kommt zur Autoinhibition des Rezeptors. Bei Vorhandensein eines Liganden bindet dieser an die Domänen I und III eines Rezeptormonomers. Es folgt eine Umgruppierung mit einer 130° Rotation der Domäne I und II (Abb. 4). Hierdurch wird der Dimerisierungsarm freigesetzt und es kommt zur Dimerbildung und Autophosphorylierung von Tyrosinresten, die zu Bindungsstellen für verschiedene Proteine werden. An EGFR-Phosphotyrosine können diverse Adaptorproteine und Enzyme mit SH2- oder PTB-Domäne binden, wie z.B. die Adaptoren Shc, Grb2 oder Crk (Dok-R) oder PLC $\gamma$ . Diese besitzen Protein-Protein-Interaktions-Domänen und putative Phosphorylierungsstellen und können so die Interaktionsmöglichkeiten des Rezeptors erweitern. Pro EGFR-Dimer werden zwei Ligandenmoleküle zur Aktivierung benötigt<sup>(255;256)</sup>.



**Abb. 4**

Aktivierung des EGFR durch Ligandenbindung. Es kommt zu einer Konformationsänderung mit 130° Rotation der Domänen I und II, wodurch der Dimerisierungsarm freigesetzt und eine Dimerisierung ermöglicht wird.<sup>(255)</sup>

#### 1.2.4.2. Signaltransduktion

Die am besten untersuchte Signalkaskade beim EGFR ist die ERK1/2-Aktivierung (extracellular regulated kinase). Rekrutierung von Shc und Grb2 an die autophosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors führt über den „nucleotide exchange factor“ Sos zur Aktivierung des kleinen G-Proteins Ras. Ras als GTPase interagiert mit der Kinase Raf und sorgt für die Lokalisation von Raf an der Zellmembran. Anschließend kommt es zur kaskadenartigen Aktivierung der Kinasen Raf, MEK1/2 und ERK1/2<sup>(257-259)</sup>. ERK1/2 phosphorylieren eine Vielzahl von Proteinen, u.a. Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, NF-AT, Pax6, c-myc, STAT3, CREB und c-fos<sup>(260-264)</sup>. Einen hemmenden Einfluß auf die Erk-Aktivierung sollen z.B. Sprouty4 bzw. Spred-Proteine ausüben<sup>(265;266)</sup>. Auch Erk5 ist für die EGF-induzierte Zellproliferation und Zellzyklusprogression entscheidend. Für diesen Signalweg ist keine Ras-Aktivität erforderlich, sondern es kann auch eine Signaltransduktion über c-Src erfolgen<sup>(267)</sup>. Als MAP-Kinase-Kinase fungiert MEK5<sup>(268)</sup>.

Die Tyrosinkinase des EGFR führt auch zur Regulierung weiterer MAP-Kinasen wie JNK (jun N-terminal kinase) und p38<sup>(269)</sup>. JNK-Aktivierung erfolgt über das kleine G-Protein Rac1 und Cdc42<sup>(270;271)</sup>. Zusätzlich wird der Serin-Threonin-Kinase JIK und dem Adaptorprotein Crk eine hemmende bzw. fördernde Rolle bei der JNK-Aktivierung zugesprochen<sup>(272;273)</sup>.

Außer den MAP-Kinasen werden noch weitere Signalmoleküle durch den EGFR beeinflusst, wenn auch die einzelnen Zwischenschritte teilweise noch unklar sind. Durch EGF läßt sich z.B. die PI3-Kinase aktivieren, allerdings nicht direkt, da der EGFR keine Bindungsstelle für eine direkte Interaktion mit der PI3-Kinase besitzt<sup>(274)</sup>. EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des Adaptorproteins Gab1 aktiviert die PI3-Kinase, wodurch es zur

Bildung von PIP3 sowie Rekrutierung und Aktivierung von Gab1 im Sinne eines positiven Feedbacks kommt. PTEN, eine Phosphatase, die PIP3 hydrolysiert, moduliert diese Feedbackschleife durch Reduktion des Membrantargeting von Gab1<sup>(275)</sup>. Ein wichtiges stromabwärts gelegenes Ziel der PI3-Kinase ist PKB / Akt<sup>(276)</sup>. PKB wirkt unter anderem antiapoptotisch und führt über Phosphorylierung von Raf zur Regulation des Ras-MAP-Kinasen-Signalweges<sup>(277;278)</sup>.

Ligandenbindung des EGFR führt auch zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-Src, die an wichtigen Zellfunktionen wie Zytoskelettorganisation und mitogenem Signaling beteiligt ist<sup>(279)</sup>. C-Src führt u.a. zur Phosphorylierung von EGFR, Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie, Shc, Zytoskelettkomponenten und Bestandteile des Endozytoseapparates wie Clathrin und Dynamin<sup>(280)</sup>. Koexpression und synergistische Funktion von EGFR und c-Src für Zellproliferation, Invasivität und Tumorbildung weisen auf eine enge Verbindung der beiden Tyrosinkinasen hin<sup>(281)</sup>. C-Src bindet direkt an den EGFR und phosphoryliert zwei Tyrosinreste, die nicht denen der Autophosphorylierung entsprechen<sup>(282;283)</sup>. Außerdem gibt es eine indirekte Src-Aktivierung durch den EGFR über die GTPase Ral<sup>(284)</sup>. Auch eine Src-abhängige Aktivierung von Jak2 und STAT-Proteinen nach EGF-Stimulation wurde beschrieben<sup>(285)</sup>.

Desweiteren interagiert der EGFR mit Integrinen, die Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrixkontakte und intrazelluläre Signalübertragung vermitteln. Über fokale Adhäsionskinasen (FAK) soll eine Verknüpfung zwischen dem EGFR und dem Integrin-Signalweg bestehen, wodurch EGF-induzierte Zellmigration unabhängig von der intrinsischen Kinaseaktivität der FAK gefördert wird. <sup>(286;287)</sup>

#### **1.2.4.3. Liganden-induzierte Endozytose**

Nach Ligandenbindung und Homo- oder Heterodimerisierung kommt es zur Wanderung in Clathrin-coated pits und zur Liganden-induzierten Endozytose. Der EGF-gebundene EGFR wird rasch internalisiert und abgebaut, während dies bei den anderen RTKs nicht der Fall ist<sup>(288)</sup>. Nach Aufnahme in leicht saure frühe Endosomen kommt es entweder zur Dissoziation zwischen Ligand und Rezeptor (TGF $\alpha$ , NRG) mit anschließendem Recycling des Rezeptors oder der Liganden-Rezeptor-Komplex bleibt stabil (z.B. EGF-EGFR) und wird in den Lysosomen abgebaut, wodurch die Anzahl der Oberflächenrezeptoren und deren Signalkapazität reduziert wird<sup>(289)</sup>. Das EGF-induzierte mitogene EGFR-Signal wird durch HER2-Heterodimerbildung und damit einhergehendem vermehrtem Recycling verstärkt<sup>(290)</sup>. Die Verteilung der internalisierten Rezeptoren innerhalb der Zelle hängt von den jeweiligen



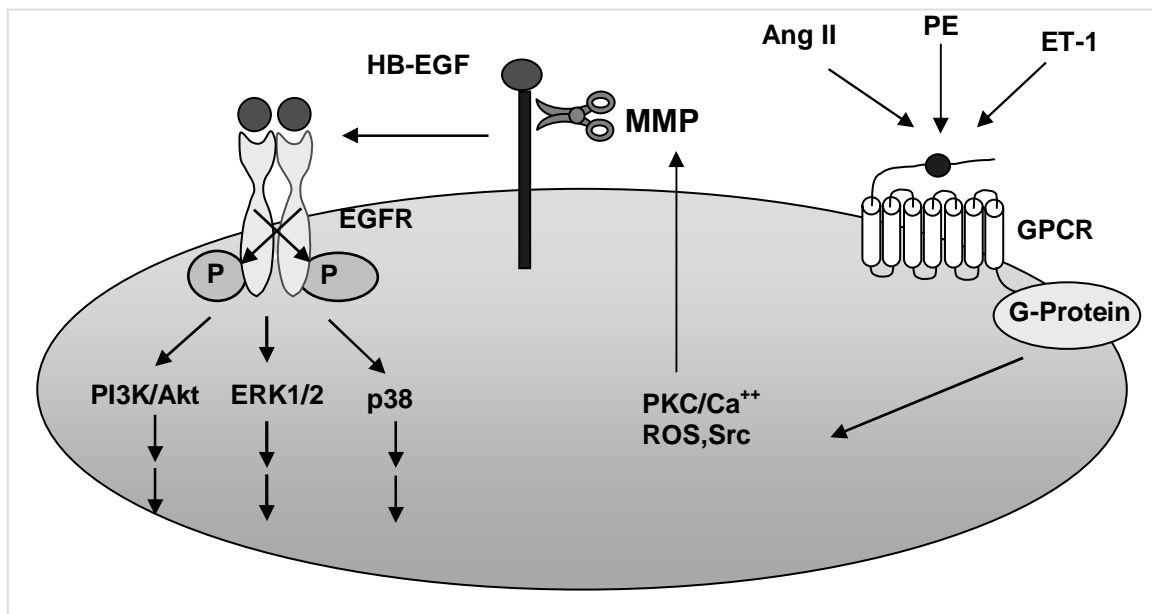
Rezeptordomänen ab. So sorgen Bereiche des c-terminalen HER3-Endes für das Recycling des Rezeptors an die Zellmembran<sup>(291)</sup>. Beim EGFR dagegen wird durch den C-Terminus die Ubiquitin-Protein-Ligase c-Cbl rekrutiert, die zur Polyubiquitinierung und damit zum lysosomalen Abbau führt.<sup>(292)</sup> EGFR-Modifizierung durch PKC (Threonin-Phosphorylierung) verhindert die Polyubiquitinierung und führt daher zum Recycling in Endosomen<sup>(293)</sup>.

#### **1.2.4.4. EGFR-Transaktivierung**

Neben der Aktivierung der MAP-Kinasen fungiert der EGFR als heterologer Signaltransduktor für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Zytokinrezeptoren, Integrine, Ionenkanäle und andere Rezeptortyrosinkinasen<sup>(294)</sup>. Um diese Art der Rezeptoraktivierung von der klassischen durch einen Liganden zu trennen, wurde der Begriff der EGFR-Transaktivierung eingeführt<sup>(295)</sup>. Auch durch hyperosmotischen Schock, UV-, Gammastrahlung, membrandepolarisierende Agenzien und verschiedene Oxidantien kann eine EGFR-Aktivierung ligandenunabhängig hervorgerufen werden<sup>(296;297)</sup>. Protein-Tyrosin-Phosphatasen und ROS werden hierbei als Vermittler angesehen<sup>(298;299)</sup>.

Der EGFR wird als wichtiger Vermittler zwischen GPCR und dem Ras-MAP-Kinasen-Signalweg, der c-fos-Gentransaktivierung und von Zellwachstum angesehen, insbesondere für Lysophosphatidylsäure, Thrombin, Endothelin-1, Angiotensin II und Phenylephrin<sup>(300-306)</sup>. EGFR-Hemmung durch den Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 oder eine dominant-negative Rezeptormutante kann den GPCR-induzierten mitogenen Signalweg in verschiedenen Zellen blockieren<sup>(307;308)</sup>. Der Mechanismus der GPCR-vermittelten Aktivierung von MAP-Kinasen führt u.a zu einer Aktivierung von Gq-Proteinen mit nachfolgender Aktivierung der PKC, der PI3-Kinase und Erhöhung des intrazellulären Calciums (s. Abb. 5)<sup>(295;307-315)</sup>. Über noch nicht genau bekannte Mechanismen kommt es außerdem zu einer vermehrten Bildung von ROS und zur Aktivierung von Pyk2 und Src<sup>(301;305;316-320)</sup>. Hierdurch wird eine Aktivierung von verschiedenen ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) erreicht, die die Abspaltung von Ligandenpräkursoren von der Zellmembran bewirken<sup>(321)</sup>. Wichtige Strukturen für die proteolytische Spaltung befinden sich für pro-TGF $\alpha$  am C-Terminus und der juxtamembranären Domäne, während für HB-EGF- und Amphiregulin-Präkursoren die zytoplasmatische Domäne nicht entscheidend ist. Für die Abspaltung von TGF $\alpha$ , HB-EGF und Amphiregulin ist ADAM17 (TACE), eine zinkabhängige transmembranäre Metalloprotease, von besonderer Bedeutung, wie Versuche mit ADAM17-k.o.-Mäusen zeigen. Da diese k.o.-Tiere im Phänotyp sehr denen ohne TGF $\alpha$  bzw. HB-EGF ähneln, wird

ADAM17 eine generelle Bedeutung beim EGFR-Signaling zugeordnet<sup>(322-325)</sup>. Außerdem kann trotz knock-ins eines unlöslichen HB-EGFs der Phänotyp gehalten werden<sup>(326)</sup>. Andere Metalloproteasen wie ADAM2, ADAM9, ADAM10 und ADAM12 sollen HB-EGF zusätzlich spalten können und besonders im kardiovaskulären System von Bedeutung sein<sup>(321;327-330)</sup>. Insgesamt sind über 25 Metalloproteasen und 29 ADAMs bekannt, wobei eine genaue Beteiligung der einzelnen Proteasen an der Regulation von EGF-ähnlichen Wachstumsfaktorpräkursoren noch unklar ist. Da das Signal mehrfach die Zellmembran passiert wird dieser Mechanismus auch als triple-membrane-passing signal mechanism (TMPS) bezeichnet.



**Abb. 5**

EGFR-Transaktivierung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR; Ang II = Angiotensin II, ET-1 = Endothelin-1, PE = Phenylephrin, MMP = Matrixmetalloprotease).

Auch für Wachstumshormon und Prolaktin, die beide zur Superfamilie der Zytokine gehören, wurde eine Stimulation der EGFR-Tyrosinphosphorylierung gezeigt<sup>(331;332)</sup>. EGFR wurde dabei direkt durch die Janus-Tyrosinkinase Jak2 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung findet an Tyr1068 statt, der Hauptbindungsstelle für Grb2 und ist unabhängig von der intrinsischen Kinaseaktivität des EGFR. Integrine können ebenso zu einer EGFR-Phosphorylierung führen, wodurch Zelladhäsion mit der MAP-Kinasen-Kaskade verknüpft wird<sup>(333)</sup>.

### **1.2.5. Nukleärer EGFR**

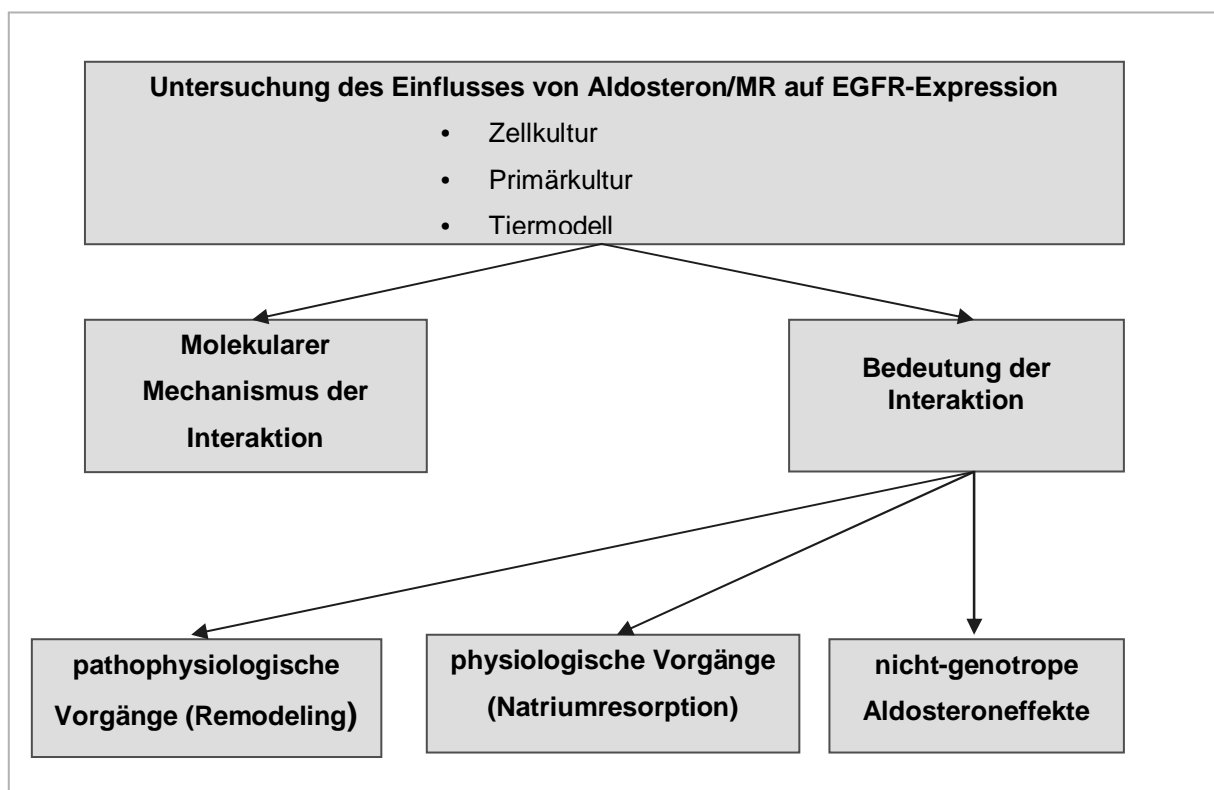
Neben der relativ gut charakterisierten Funktion als Membranrezeptor wird dem EGFR zusätzlich eine Aufgabe im Kern bzw. in der perinukleären Region zugeschrieben<sup>(334)</sup>. Dies soll insbesondere schnell proliferierende Gewebe wie Plazenta und Tumoren betreffen. Da der EGFR keine DNA-Bindungssequenz besitzt, wird eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren postuliert, wodurch es zu einer vermehrten Expression von Genen wie Cyclin D1, iNOS und B-Myb kommt, die alle mit erhöhter Zellproliferation assoziiert sind<sup>(335)</sup>. Hinweise für Importmechanismen sind bereits vorhanden. Ebenso wurde ein NLS (nuclear localization signal) in der juxtamembranären Region des EGFR gefunden<sup>(336)</sup>.

### **1.3. Zielsetzung der Arbeit**

In aktuellen klinischen Studien (RALES und EPHEsus) konnte durch Gabe von MR-Antagonisten die Mortalität und Morbidität von Patienten mit Herzinsuffizienz bzw. nach Myokardinfarkt signifikant reduziert werden<sup>(167;168)</sup>. Es wird angenommen, dass diese Effekte über eine Hemmung von Remodelingvorgängen am Herz-Kreislauf-System hervorgerufen werden, die ansonsten bei pathophysiologisch erhöhten Aldosteronkonzentrationen auftreten. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar. Für den EGFR ist bekannt, dass auch er an Umbauvorgängen und Fibroseentstehung mitwirken kann<sup>(337-339)</sup>. Außerdem kann er als heterologer Signaltransduktor für vasoaktive Peptide fungieren und damit deren fibrotische und hypertrophe Wirkung verstärken. Eine attraktive Hypothese zur Erklärung der pathophysiologischen Wirkung von Aldosteron wäre daher eine Interaktion mit dem EGFR-Signalweg. Da hieraus neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten gegen kardiovaskuläres Remodeling und Fibroseentwicklung entstehen könnten, ist dieser Ansatz besonders interessant. In der Literatur gibt es bereits einige Hinweise für eine Interaktion zwischen Aldosteron/MR und dem EGFR-Signaltransduktionsweg. Zum Beispiel können Mineralocorticoide die EGF-induzierte Kontraktion von Arterien verstärken<sup>(340)</sup>. Durch den MR-Antagonisten Spironolacton dagegen, kann nach zerebraler Ischämie zusätzlich zum Ausmaß des Infarktes auch die EGFR-mRNA Konzentration gesenkt werden<sup>(341)</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob tatsächlich eine Interaktion zwischen den Signaltransduktionswegen des aktivierten MR und des EGFR besteht. Diese könnte besonders für die Aufklärung der Mechanismen der pathologischen Aldosteronwirkungen von Relevanz sein. Hierfür sollte zuerst die langfristige Wirkung des aktivierten MRs auf die EGFR-Expression untersucht werden, und zwar sowohl in Zellkulturen als auch im

Tiermodell. Anschließend sollte der molekulare Mechanismus dieser Interaktion näher charakterisiert und erste Hinweise für eine pathophysiologische Relevanz der Interaktion gesucht werden. Zusätzlich sollten die Auswirkungen auf die Natriumresorption als klassischen physiologischen Aldosteroneffekt berücksichtigt werden. Da Aldosteron neben den langfristigen genomischen Wirkungen schnelle nicht-genotrope Effekte auslösen kann, sollten auch diese berücksichtigt werden. Daher wurde der Einfluß einer kurzfristigen Aldosteroninkubation auf verschiedene MAP-Kinasen getestet. Neben der Rolle des MR bei diesen Phänomenen sollte auch die Funktion der schnellen MAP-Kinasen-Effekte erörtert werden, insbesondere eine mögliche Wirkung auf genomische Effekte.



**Abb. 6**

Zusammenfassung der Ziele der Arbeit.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1. Phenol-Extraktion

DNA wurde mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v) versetzt, 10 sek mit einem Vortex gemischt und dann bei 13 000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Hiernach befand sich die DNA in der oberen wässrigen Phase.

#### 2.1.2. Ethanol-Fällung

Zu der gelösten DNA wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugefügt. Anschließend wurde die DNA nach Zugabe von 2,5 Volumenteilen Ethanol bei -20° C über mindestens 1 h gefällt, bei 4° C und 13 000 rpm pelletiert und mit 75% Ethanol gewaschen. Die Resuspension erfolgte in H<sub>2</sub>O.

#### 2.1.3. Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer DNA wurden die Zellen in Verdauungspuffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris-Base pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,1 mg/ml Proteinase K) über Nacht bei 50° C inkubiert. Es folgte eine Phenol-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung der DNA.

#### 2.1.4. Isolierung von Plasmiden

Plasmiden wurden entweder mit dem Miniprep Kit oder dem Midiprep Kit von Qiagen über eine Silika-Matrix-Säule isoliert.

#### 2.1.5. Isolierung von RNA

RNA-Isolierung erfolgte nach den Anweisungen der Hersteller entweder mit TRIzol Reagent (Invitrogen) oder mit dem AquaPure RNA Isolations Kit von Bio-Rad.

#### 2.1.6. Quantifizierung von DNA und RNA

Die Quantifizierung der DNA- und RNA-Proben erfolgte mit einem UV-Spektrometer (Biorad) bei 260 nm (Konversionsfaktor für Absorption 1,0 = 50 µg/ml für DNA und 1,0 = 40 µg/ml für RNA).

### **2.1.7. DNA-Gelelektrophorese**

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in 0,5-2%igen Agarosegelen in einer horizontalen Gelkammer. Als Laufpuffer wurde 0,5fache TAE-Lösung verwendet (aus 10x TAE-Stammlösung: 242 g TRIS; 57,1 ml Eisessig; 37,2 g EDTA ad 1 l Aqua). Nach Verdünnung der DNA-Proben mit 10x Ladepuffer (20% Ficoll 400; 0,1 M EDTA pH 8,0; 1% SDS; 0,25% (w/v) Bromphenolblau) wurden sie in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Längenbestimmung wurde eine DNA-Leiter von Roche bzw. Pequelab benutzt. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 10 V/cm Gel angelegt. Die Detektion erfolgte durch nachfolgende Inkubation mit Ethidiumbromidlösung (1000x Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,5 mg/ml) für 15 min gefolgt von zwei Waschschritten mit destilliertem Wasser à 15 min. Die Banden wurden auf einem Transilluminator (Biometra) mit UV-Licht bei 355 nm sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera fotografiert.

### **2.1.8. Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Herstellung von Plasmiden wurden die entsprechenden Proben mit einem 0,5-2%igen Agarosegel aufgetrennt, durch Ethidiumbromid auf einem Transilluminator sichtbar gemacht, mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und dann mit dem QIAquick Gel Extraction Kit vom Qiagen extrahiert.

### **2.1.9. Restriktion von DNA-Fragmenten**

Die Restriktionen wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen von New England Biolabs mit den mitgelieferten 10x NEB-Puffern und jeweils empfohlenen Zusatzreagenzien wie BSA oder S-Adenosyl-Methionin durchgeführt (siehe [www.neb.com](http://www.neb.com)).

### **2.1.10. Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Bei Klonierungen, bei denen Vektor und Insert am 3'- und 5'-Ende identische Schnittstellen besaßen, wurde der Vektor vor der Ligation dephosphoryliert, um einen endogenen Verschluss zu verhindern. Hierfür wurde der Vektor 40 min bei 37° C mit CIP (calf intestine phosphatase) von NEB inkubiert und anschließend über ein Agarosegel und Gelextraktion aufgereinigt, um das Enzym zu entfernen. Die Reaktion erfolgte entweder in dem mitgelieferten Puffer oder im Restriktionsansatz nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme.

### **2.1.11. TA Cloning**

Um PCR-Stücke zur weiteren Vermehrung oder Sequenzierung in einen Vektor einzubringen wurde das TA Cloning Kit von Invitrogen mit dem pCR2.1-Vektor benutzt. Dieser Vektor ist bereits aufgeschnitten und besitzt an seinen Enden jeweils einen überstehenden Thymidinrest als Einzelstrang, der mit den Einzelstrang-Adenosinresten von mit Taq-Polymerase synthetisierten PCR-Stücken reagieren kann.

### **2.1.12. Herstellen kompetenter Bakterien**

Als kompetente Bakterien wurden One Shot<sup>®</sup> Top10F' chemically competent cells von Invitrogen benutzt. Alternativ wurden Bakterien nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode kompetent gemacht. Hierfür wurden 2 ml einer Bakterienvorkultur in 400 ml LB-Medium bei 37° C in einem Schüttler bei 250 rpm über Nacht inkubiert bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,375. Es folgte eine Inkubation für 10 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation bei 1600 g für 7 min bei 4° C. Das Pellet von jedem Falconröhrchen wurde dann in 10 ml eiskalter steriler CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert (60 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerol; 10 mM PIPES pH 7,0) und dann erneut zentrifugiert, diesmal für 5 min bei 1100 g und 4° C. Das Pellet wurde noch einmal in 10 ml eiskalter steriler CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und dann 30 min bei 4° C in Suspension gehalten. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 1100 g und 4° C wurde das Pellet dann in 2 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -70° C gelagert.

### **2.1.13. Transformation von kompetenten Bakterien**

Zur Transformation der One Shot<sup>®</sup> Top10F' cells von Invitrogen wurde ein Bakterienaliquot vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit 1-20 µl Plasmid gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann 30 sek einer Temperatur von 42° C ausgesetzt, um die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien zu erreichen. Im Anschluss daran erfolgte eine Vermehrung der transformierten Bakterien für eine Stunde bei 37° C in SOC-Medium mit nachfolgender Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten bei 37° C über Nacht.

Bei den nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode kompetent gemachten E. coli wurden 100 µl Bakterienlösung mit dem Plasmid auf Eis vermischt, kurz geschüttelt und dann für 10 min inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 2 min wurden die Bakterien mit 1 ml LB-Medium bei 37° C unter Schütteln inkubiert und dann auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum selektioniert.

#### 2.1.14. PCR

PCR wurde mit dem Taq PCR Kit von Qiagen wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Der Mastermix wurde nach dem unten aufgeführten Schema hergestellt bzw. für 25 µl oder 100 µl Reaktionsansätze angepasst.

Reagenz	Endkonzentration
10x PCR Puffer	1x
5x Q-Puffer	1x
dNTP (jeweils 10 mM)	jeweils 200 µM
Primer Sense (10 µM)	0,1-0,5 µM
Primer Antisense (10 µM)	0,1-0,5 µM
Taq Polymerase	2,5 u
Template	100 ng–1 µg
Aqua	ad 50 µl

**Tab. 4**

Typisches Pipettierschema für eine PCR mit dem Taq PCR Kit von Qiagen.

#### 2.1.15. RT-PCR

Die reverse Transkriptase PCR wurde mit dem SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit von Invitrogen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Reagenz	Endkonzentration
2x Reaction Mix	1x
Template RNA	10 pg-1 µg
Primer Sense (10 µM)	0,2 µM
Primer Antisense (10 µM)	0,2 µM
RT/Platinum Taq Mix	0,5 µl/25 µl Ansatz
Aqua	ad 25 µl

**Tab. 5**

Typisches Pipettierschema für eine RT-PCR mit dem SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit von Invitrogen.

Die für die PCR und RT-PCR verwendeten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgezählt.



Nachweis	Primer (sense)	Primer (antisense)	Reaktionsbedingungen
humaner MR	5'-ACA CTG CTT CTG GCA CCT CT-3' (hMinRez left)	5'-AAA GCT CCA TCT GGT TCT GG-3' (hMinRezright2)	Anlagerungstemperatur: 57° C 35 Zyklen Produktgröße 190 bp
humaner MR	5'-ATC ACG ATC GGC TAG AGA CC-3' (MR-Intron-left-1-new)	5'-CCC ATA ATG GCA TCC TGA Ag-3' (MR-Intron-right-1-new)	Anlagerungstemperatur: 57° C 35 Zyklen Produktgröße 244 bp
humaner MR	5'-ATG GGT ATC CGG TCT TAG AAT AC-3' (MR-Intron-left-2-new)	5'-CTC AAG GCA AAT GAT GAT AGA CA-3' (MR-Intron-right-2-new)	Anlagerungstemperatur: 57° C 35 Zyklen Produktgröße 730 bp
humaner GR	5'-TCC CTT TCT CAA CAG CAG GAT-3'	5'-CAA TCA TTC CTT CCA GCA CAT-3'	Anlagerungstemperatur: 55° C 35 Zyklen Produktgröße 371 bp

**Tab. 6**

Primer für PCR und RT-PCR.

### 2.1.16. Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden kommerziell von MWG (Value Read System) durchgeführt.

### 2.1.17. Herstellung von Plasmiden

#### Umklonierung des pcDNA1-hMR zum pcDNA3-hMR

Der pcDNA1-hMR wurde uns von M.V. Govindan (Université Laval Québec, Canada) zur Verfügung gestellt. Für die Umklonierung wurde der hMR aus dem pcDNA1-Vektor durch HindIII und XhoI herausgeschnitten und das pcDNA3-Plasmid (Invitrogen) mit den gleichen Enzymen aufgeschnitten. Anschließend wurden die Fragmente beider Ansätze über ein 0,8%iges Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht. Die gewünschten Banden von ca. 4350 bp (hMR und 1398 nicht-codierende Basenpaare am 3'-Ende) und 5400 bp (pcDNA3) wurden mit einem sterilen Skalpell exzidiert und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen eluiert. Die Ligation wurde mit T4 DNA Ligase (NEB) in einem 10 µl Ansatz in entsprechend verdünntem Ligationsbuffer bei 14° C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden OneShot™-Top10F' cells von Invitrogen transformiert und auf LB-Agarplatten mit 60 mg/l Ampicillin bei 37° C über Nacht selektioniert. Es wurden 6 Kolonien gepickt und in einer 5 ml Kultur mit LB-Medium und Ampicillin (60 mg/l) über Nacht bei 37° C und 225 rpm gezüchtet. 850 µl davon wurden mit 150 µl Glycerin eingefroren, während aus dem Rest in einer Minipräparation Plasmid isoliert wurde, dass dann durch erneute Restriktion mit HindIII und XhoI auf das Vorhandensein der richtigen Fragmentlängen geprüft wurde.

### Herstellung des pcDNA3-HisMR

Da der humane MR selbst in überexprimierenden Zellen mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern nicht sicher nachweisbar ist, wollten wir ihn am 5'-Ende mit einem His-Tag markieren. Dies hätte auch den Vorteil, dass der MR über entsprechende Nickelsäulen isoliert und aufgereinigt werden könnte. Hierfür stellten wir durch PCR den Anfangsteil des hMR her, der am 5'-Ende eine zusätzliche HindIII-Schnittstelle und sechs Histidinresten besaß sowie am 3'-Ende eine BsgI-Schnittstelle (Primer siehe Tabelle 7). Das PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor von Invitrogen subkloniert und durch Blau-Weiß-Screening und Sequenzierung identifiziert. Es folgte die Restriktion des subklonierten PCR-Stückes an den HindIII- und BsgI-Schnittstellen der Primer. Gleichzeitig wurde auch aus dem pcDNA3-hMR mit HindIII und BsgI der Anfangsteil des MR entfernt. Beide Restriktionsansätze wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und die passenden Banden exzidiert und eluiert. Diese wurden ligiert, transformiert, selektioniert und dann durch Sequenzierung identifiziert.

<b>Sense MR-His-Tag for</b>	5'-AGA CCC AAG CTT ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT GAG ACC AAA GGC TAC CAC AGT CTC CC-3'
<b>Antisense MR-His-Tag back</b>	5'-CAC ATT GCT AGC ATG TGC AGG GCT GTG CGA CCT GGA GCC TCG ATT TTC AGC ATT A-3'

**Tab. 7**

Primer für die Herstellung des pcDNA3-HisMR-Fragmentes mit einer erwarteten Produktgröße von 735 bp.

### Herstellen des pcDNA3.1HisC-hMR

Hierfür wurde der hMR aus dem pEGFP-hMR (von N. Farman, INSERM Unité 478, Paris zur Verfügung gestellt) durch ApaI und BglII herausgeschnitten und durch Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt. Im Anschluss daran wurde er mit mit ApaI und BamHI linearisiertem pcDNA3.1HisC-hMR ligiert (Invitrogen). Hierbei ist zu beachten, dass BglII und BamHI kompatible Enden produzieren. ApaI hat bei 25° C seine optimale Aktivität, so dass wir zunächst für 6 h mit ApaI inkubierten und die Restriktion mit BglII bzw. BamHI dann über Nacht bei 37° C anschlossen. Nach Ligation erfolgte wieder die Transformation, Selektion, Plasmidisolierung und anschließende Kontrolle der erhaltenen Plasmide durch Restriktion und Sequenzierung. Zusätzlich wurde aus pcDNA3-MR der MR durch EcoRV herausgeschnitten und ebenfalls in den pcDNA3.1HisC eingefügt.

### Umklonierung des humanen Glucocorticoidrezeptors

Der humane Glucocorticoidrezeptor wurde uns freundlicherweise von M. Govindan im pcDNA1-Vektor überlassen. Zum besseren Vergleich mit dem hMR erfolgte eine Umklonierung in den pcDNA3.1HisB (Invitrogen). Hierfür wurde der GR aus dem pcDNA1 mit EcoRI herausgeschnitten, über ein Agarosegel mit Gelextraktion aufgereinigt und anschließend mit dem linearisierten und dephosphorylierten pcDNA3.1HisB ligiert. Die Plasmide der nach der Transformation und Selektion mit Ampicillin erhaltenen Bakterienklone wurden durch Restriktion mit SalI analysiert und zur Identifizierung sequenziert.

### Herstellung trunkierter Varianten des humanen Mineralocorticoidrezeptors

Der hMR wird in die Domänen A-F eingeteilt (s. Abb. 1). Um die Bedeutung der einzelnen Domänen für verschiedene Effekte des MR zu untersuchen, stellten wir trunkierte Varianten des MR, bestehend aus der Domäne A/B, den Domänen C/D/E/F, D/E/F oder E/F her. Die verwendeten Restriktionsenzyme und Primer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die Subklonierung der PCR-Fragmente erfolgte im pCR2.1-Vektor mit Blau-Weiß-Selektion. Für das A/B-Fragment (aa1-516) wurde der hintere Teil des Rezeptors durch EcoRI entfernt und das Restplasmid religiert.

<b>trunkierter Rezeptor (vorhandene Aminosäuren)</b>	<b>Sense Primer</b>	<b>Antisense Primer</b>
<b>CDEF (aa601-984)</b>	5'-AGA TCT ATA TGT TTG GTG TGT GGG-3' (BglII)	5'-AAG CTT TCA CTT CCG GTG GAA GTA GA-3' (HindIII)
<b>DEF (aa682-984)</b>	5'-AGA TCT GGG ATT CAC GAG GAG CAG-3' (BglII)	5'-AAG CTT TCA CTT CCG GTG GAA GTA GA-3' (HindIII)
<b>EF (aa735-984)</b>	5'-AGA TCT ACA CCT TCC CCG TTA TG-3' (BglII)	5'-AAG CTT TCA C TT CCG GTG GAA GTA GA-3' (HindIII)

**Tab. 8**

Primer für die Herstellung der trunkierten Varianten des hMR.

### Herstellung verschieden langer Fragmente des EGFR-Promotors

Das pERLuc-Plasmid (von A. Johnson, NIH, Bethesda, MD hergestellt) enthält die 1118 bp stromaufwärts des Startcodons des EGFR, die mit HindIII-Linkern versehen und in den pGL3-Basic-Vector (Promega) eingefügt worden sind. Folglich wird die stromabwärts vom EGFR-Promotor liegende Firefly Luciferase bei Aktivierung des Promotors exprimiert. Für

die Untersuchung kürzerer Promotorstücke wurden entweder Teile des Promoters mit Restriktionsenzymen entfernt und die Enden religiert oder es wurden Fragmente des Promoters durch PCR hergestellt und in den aufgeschnittenen Vektor eingefügt.

Für das Luc-163-Konstrukt wurden die Basenpaare -1118-(-163) durch NheI aus dem pERLuc-Plasmid herausgeschnitten, das Restplasmid wurde aufgereinigt und religiert. Nach dem gleichen Prinzip nur durch Restriktion mit BglII wurde das Luc-864-Konstrukt gebaut. Die anderen Plasmide wurden durch Einfügen von PCR-Fragmenten gewonnen. Mit den in der Tabelle angegebenen Primern wurden Promotoranteile durch PCR hergestellt, die am 5'- und am 3'-Ende mit zusätzlichen Restriktionsstellen versehen waren. Diese PCR-Produkte wurden in den pCR2.1-Vektor eingefügt und in TopF10'-Bakterien transformiert. Durch Blau-Weiß-Screening wurden Bakterienklone mit Insert identifiziert. Von diesen wurden die Plasmide gewonnen und durch Restriktion charakterisiert. Anschließend wurde das Insert mit KpnI und NheI exzidiert und mit dem ebenso aufgeschnittenen und aufgereinigten pERLuc-Plasmid ligiert. Im Falle des -316-bp-Fragmentes erfolgte eine zusätzlich Klonierung in den linearisierten pSEAP-basic-Vektor.

Deletionskonstrukt	Primer sense	Primer antisense
<b>Luc-510</b>	5'-GGT ACC TCT CGG AAA TTA ACT CCT-3' (KpnI)	5'-GAG CTC GCT CCG GCT CTC CCG ATC- 3' (Sac I) / (NheI)
<b>Luc-Del-510--163</b>	5'-GGT ACC GAT CTG AAG GAC CCT CG-3' (KpnI)	5'-GCT AGC GGG CGT TCC CAG CAC TG- 3' (NheI)
<b>Luc-460</b>	5'-GGT ACC CAC TCC CGC CGG AGA CTA-3' (KpnI)	5'-CGG CTC TCC CGA TCA ATA C-3' (NheI)
<b>Luc-352</b>	5'-GGT ACC TCT CCT CCT CCT CTG CTC CT-3' (KpnI)	5'-CGG CTC TCC CGA TCA ATA C-3' (NheI)
<b>Luc-316</b>	5'-GGT ACC GCC TGG TCC CTC CTC CTC-3' (KpnI)	5'-CGG CTC TCC CGA TCA ATA C-3' (NheI)

**Tab. 9**

Primer für die Herstellung der EGFR-Promoterfragmente.

## 2.2. Reporter-Gen-Assays

### 2.2.1. EGFR-Promotor -Studien

Der EGFR-Reporter-Gen-Assay wurden genutzt, um Aktivitätsstudien mit unterschiedlich langen Fragmenten des EGFR-Promoters durchzuführen. Hierfür wurden die verschiedenen Promotorfragmente mit einem Luciferase-Reporter-Gen verknüpft, das in einen pGL3-Vektor kloniert worden war. Der Ursprungsvektor mit dem kompletten EGFR-Promotor stammt von A. Johnson, NIH, Bethesda, MD. Um den Einfluß des Mineralocorticoidrezeptors auf den

EGFR-Promotor zu untersuchen, wurde dieses Konstrukt zusammen mit dem pEGFP-MR-Plasmid, das den humanen Mineralocorticoidrezeptor kodiert, transient in HEK-293 oder CHO-K1-Zellen transfiziert. Konstitutiv exprimiertes pcDNA3.1His-LacZ-Plasmid (Invitrogen) oder pSEAP2-Plasmid diente als interne Kontrolle. Die Experimente wurden in 96-well-Platten durchgeführt, wobei die Zellen pro Loch mit 40 µl 1x Reporter Lysis Buffer von Promega und einem Einfrier-Auftau-Zyklus lysiert wurden. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde durch eine enzymatische Farbreaktion mit ONPG (O-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid) quantifiziert. Hierfür wurden 10 µl des Zelllysates mit 50 µl Cleavage Buffer + β-Merkaptoethanol (10x Cleavage Buffer: 0,6 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,4 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 0,1 M KCl; 0,01 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O pH 7; in 100 ml 1x Cleavage Buffer 270 µl 14,3 M β-Merkaptoethanol geben) und 20 µl ONPG (4 mg/ml) für 30 min in einem 37° C Wasserbad inkubiert. Mit 125 µl 1 M Natriumcarbonat wurde die Reaktion beendet. Anschließend wurde die OD bei 420 nm gemessen. pSEAP2 führt zur Bildung von sekretorischer alkalischer Phosphatase, deren Aktivität mit dem AttoPhos Kit von Promega bestimmt wurde. Hierbei entsteht das stark fluoreszierende BBT-Anion (2'-[2-Benzothiazoyl]-6'-Hydroxy-Benzothiazol), das mit einem Multilabel Counter (Victor<sup>2</sup> Wallac) gemessen wurde. Die Luciferaseaktivität wurde durch Quantifizierung von Biolumineszenz mit dem Luciferase Assay Reagent von Promega gemessen, wobei 30 µl Zelllysate mit 100 µl Reagenz gemischt wurden.

### **2.2.2. GRE-Reporter- Gen-Assay**

Transaktivierungsaktivität am Glucocorticoid-Response-Element (GRE) wurde mit dem Mercury Pathway Profiling Reporter Gene Assay System (Clontech) bestimmt, bei dem eine sekretorische alkalische Phosphatase stromabwärts von 3 GREs transkribiert wird. HEK-293-Zellen wurden mit pGRE-SEAP und pEGFP-hMR oder einem Leervektor transfiziert und die SEAP-Aktivität wurde mit dem AttoPhos System gemessen. Interne Transfektionskontrollen waren Plasmide, die für β-Galaktosidase oder EGFP kodieren (pcDNA3.1His-LacZ von Invitrogen oder pEGFP-C1 von Clontech).

## **2.3. Zellkultur**

### **2.3.1. Zelllinien**

#### CHO-K1-Zellen

Die CHO-Zellen (ATCC, Manassas, VA) wurden in Ham-F12- Medium, das mit 10% FCS angereichert wurde, bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Es handelt sich um Ovarzellen des chinesischen Hamsters (Fibroblasten).

#### HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen (ATCC, Manassas, VA) wurden mit DMEM-Ham-F12-Medium plus 13 mM NaHCO<sub>3</sub>, 15 mM HEPES, 5 mg/l Apo-Transferrin, 5 mg/l Insulin, 0,1 µM Hydrocortison, 10 µg/l EGF, 5 µg/l Natriumselenit und 10% FCS bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Es handelt sich um humane embryonale Nierenzellen.

#### MDCK-Zellen (Subklon C7)

Der MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) Subklon C7 zeigt die Charakteristika von Hauptzellen der Niere, nämlich amilorid-sensitiven Na<sup>+</sup>-Transport und Ansprechen auf Aldosteron. Die Zellen wurden in MEM mit 10% FCS bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### OK-Zellen

OK-Zellen stammen aus der Niere eines Opossums und wurden von Dr. Biber (Physiologisches Institut der Universität Zürich) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in MEM pH 7,4 unter Zufügen von 10% FCS (fetales Kälberserum) und 24 mmol/l NaHCO<sub>3</sub> bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und je nach Wachstum 1-2x wöchentlich subkultiviert. Hierfür wurden die Zellen mit EDTA-Lösung (0,2 g/l) gewaschen und mit Trypsin von der Unterlage abgelöst. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die restliche Trypsinwirkung beendet. Anschließend wurden die Zellen für Versuche oder weitere Kultivierung angesät. Jeweils 24 h vor einem Experiment wurden die Zellen auf serumfreies Medium ohne Zusätze umgestellt, um eine hormonelle Grundstimulation zu vermeiden.

### **2.3.2. Primärzellkulturen**

#### RPTEC

Primärzellen der humanen Nierenrinde, RPTEC (Clonetics, Walkersville, MD), wurden nach den Angaben des Herstellers kultiviert und passagiert.

### HAoEC

Humane aortale Endothelzellen (= HaoEC) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) wurden nach den Empfehlungen des Vertreibers in Spezialmedium (endothelial cell growth medium microvascular) kultiviert.

### HAoSMC

Humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen (= HAoSMC) wurden ebenfalls von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) erworben und nach Anleitung der Firma gehalten.

Auch die Primärkulturzellen wurden 24 h vor einem Experiment mit serumfreiem Medium gehalten.

### **2.3.3. Transiente Transfektionen**

Transiente Transfektionen wurden nach der Lipofektionsmethode bei ca. 80% konfluenten Zellen durchgeführt. Für CHO-K1- und HEK-293-Zellen wurde hierfür Polyfect und für OK-Zellen Effectene (beide Qiagen, Hilden, Deutschland) wie vom Hersteller empfohlen eingesetzt, wobei stets mit serumfreiem Medium transfiziert und das Transfektionsgemisch nach 12-24 h durch frisches Medium ersetzt wurde.

### **2.3.4. Herstellung stabiler Zellklone**

Zur Herstellung stabiler Zellklone wurden die jeweiligen Zellen mit dem jeweiligen Plasmid, transfiziert. Im Anschluss daran erfolgte eine Selektion, die je nach Selektionsmarker auf dem Plasmid mit Puromycin (5 mg/l) oder mit Geneticin (G418 600 mg/l) durchgeführt wurde. Nachdem nicht transfizierte Kontrollzellen vollständig abgestorben waren, wurde eine Verdünnungsklonierung in einer 96-well-Platte durchgeführt. Einzelne Klone wurden dann auf das Vorhandensein des entsprechenden Plasmids mittels RT-PCR, Western Blots und/oder Fluoreszenzmikroskopie getestet.

## **2.4. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.4.1. Herstellung von Zelllysaten**

Die Zellen wurden jeweils dreimal mit eiskaltem PBS (10 X PBS: 80 g/l NaCl; 2 g/l KCl; 14,42 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen, in Pelletpuffer (PBS mit 184 mg/l Natriumorthovanadat, 1 mM EDTA und 1:1000 Proteasen-Inhibitor-Cocktail-Set III, Calbiochem) abgekratzt, bei 2000 g für 5 min zentrifugiert, in entsprechendem Lysepuffer

aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde dann bei 4° C und 6000 rpm für 15 min zentrifugiert. Es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

Lysepuffer	Bestandteile
<b>Triton X-100 Lysepuffer</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 5 mM EDTA; 200 µM Natriumorthovanadat; 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µM Pepstatin A; 40 mg/l Betastatin; 2 mg/l Aprotinin; 1% Triton X-100
<b>RIPA Puffer I (alt)</b>	PBS mit 1 % Nonidet P-40; 0,1% SDS; 184 mg/l Natriumorthovanadat; 0,1% Triton X-100; 1/1000 Proteasen-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem)
<b>RIPA Puffer II</b> (nach LeMoellic et al. <sup>(35)</sup> )	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 2,4 mM EDTA; 1/1000 Proteasen-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem)
<b>ERK-Lysepuffer</b>	0,1% Triton X-100 in PBS; 37 mg/l Natriumorthovanadat; 1/1000 Proteasen-Inhibitor-Cocktail
<b>Cell Extraction Buffer</b>	10 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM NaF; 20 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; 2 M Natriumorthovanadat; 1% Triton X-100; 10% Glycerol; 0,1% SDS; 0,5% Deoxycholat; 1/1000 Proteasen-Inhibitor-Cocktail

**Tab. 10**

Zusammensetzung der verschiedenen Lysepuffer.

Alternativ wurden die Zellen mit Laemmli-Puffer lysiert und mehrmals durch eine 21 G Kanüle gedrückt bis die Konsistenz flüssig war. Vor Auftragung auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proteine immer für 5 min bei 95° C in einem Heizblock denaturiert.

#### **2.4.2. Isolierung von nukleären Proteinen** (modifiziert nach Schreiber<sup>(342)</sup>)

Für den Electromobility Shift Assay (EMSA) wurden nukleäre Proteinextrakte mit entsprechenden Sonden inkubiert. Um die nukleären Proteine zu gewinnen, wurden die HEK-Zellen aus 100x20 mm Petrischalen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS mit 1/1000 Proteasen-Inhibitor-Cocktail (Calbiochem) aufgenommen. Nach Zentrifugieren für 5 min bei 4° C und 2000 rpm wurden die Zellen in 180 µl Äquilibriumspuffer (10 mM TRIS pH 7,3; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM β-Merkaptoethanol) resuspendiert und bei 13 000 rpm und 4° C kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 240 µl Lysepuffer (Äquilibriumspuffer + 0,4% Nonidet P-40) für 10 min auf Eis



inkubiert, um eine Zellyse zu erreichen. Es folgte eine Pelletierung der Zellkerne mit nukleären Proteinen durch Zentrifugation bei 4° C für 5 min und 13 000 rpm. Nach Resuspension des nukleären Pellets wurde dieses in 60 µl Extraktionspuffer (20 mM HEPES; 0,4 M NaC; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF) resuspendiert und für 15 min im Kühlschrank geschüttelt. Zum Schluß wurden die größeren Kernbestandteile bei 13 000 rpm für 5 min abzentrifugiert, so dass die Kernproteine aus dem Überstand für den EMSA verwendet werden konnten.

### **2.4.3. Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag**

Um His-markierte Proteine aus Proteinlysaten aufzureinigen, verwendete wir die His-Select™ Spin Columns von Sigma. Diese bestehen aus Silika-Partikeln, die an Nickelionen gekoppelt sind. Nach Äquilibrieren der Säulchenmatrix mit Equilibration Buffer (50 mM Natriumphosphat; 0,3 M NaCl; 5 mM Imidazol pH 8,0) und Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 min wurde das Säulchen mit der Probe beladen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit Wash Buffer (Equilibration Buffer mit zusätzlich 5 mM Imidazol) gewaschen und mit Eluation Buffer (Equilibration Buffer mit zusätzlich 250 mM Imidazol) eluiert.

### **2.4.4. Proteingehaltbestimmung**

Je nach Experiment und im Lysat vorhandenen Zusatzsubstanzen wurden unterschiedliche Methoden zur Bestimmung des Proteingehaltes angewandt.

#### BCA (Bicinchinonsäure Assay)

Routinemäßig wurde die Proteinbestimmung nach der BCA-Methode durchgeführt, bei der Proteine in alkalischer Lösung  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduzieren, die dann mit Bicinchinonsäure einen violetten Farbkomplex bilden. Hierfür wurden 50 Teile BCA-Reagenz (Pierce, Rockford, Il) mit einem Teil 4%  $\text{CuSO}_4$  gemischt. 15 µl der Probe oder weniger wurden mit 300 µl des Reaktionsgemisches für 30 min bei 37° C inkubiert und die Extinktion wurde dann mit einem Multiwell Counter bei 560 nm gemessen. Eine entsprechende Standardkurve mit BSA (0, 100, 300, 500, 700 mg/l) wurde jeweils mitgemessen.

### Bradford-Assay

Alternativ wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt, bei der Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurem Milieu an Proteine bindet und so sein Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschiebt. Für die Quantifizierung wurde das Bradford Reagenz von Bio-Rad 1:5 mit Wasser verdünnt. 5-10 µl Proteinlysate oder BSA-Standardlösungen (0, 100, 300, 500, 700 mg/l) wurden mit 200 µl des verdünnten Reagenz in einer 96-well Schale gemischt. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 590 nm mit einem Multiwell Counter (Victor<sup>2</sup>, Wallac, Turku, Finnland).

### Trypanblau-Lösung

Um nach einem Direkt-ELISA den Proteingehalt pro well bestimmen zu können, wurden die Zellen nach Messung der Meerrettichperoxidase-Aktivität mit PBS dreimal gewaschen und anschließend 5 min mit 50 µl einer 0,2%igen Trypanblaulösung inkubiert. Der Farbstoffüberschuß wurde durch viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl einer 1%igen SDS-Lösung (in PBS) lysiert. Die Extinktion wurde bei 560 nm gemessen.

## **2.4.5. ELISA**

### Direkt-ELISA (nach Versteeg et al<sup>(343)</sup>)

Zellen wurden auf 96-well-Platten angesät und für 24 h ohne Serum gehalten. Je nach Experiment folgte eine Stimulation mit unterschiedlichen Substanzen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd fixiert, mit PBS dreimal gewaschen und mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen dann mit 10% FCS in PBS/Triton X-100 inkubiert und mit dem entsprechenden Erstantikörper für 1 h auf einer Wippe geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Zweitantikörper in PBS/Triton X-100 mit 5% BSA für 1 h. Danach wurde mit PBS/Triton X-100 und dann mit PBS alleine mehrmals gewaschen. Zur Detektion wurden die Zellen mit 50 µl Substrat (0,4 mg/ml O-Phenylendiamin; 11,8 mg/ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 7,3 mg/ml Zitronensäure und 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und der Farbumschlag bei 490 nm mit einem Multiwell Multilabel Counter gemessen. Eine zweite Messung erfolgte nach Zugabe von H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die dazugehörigen Proteinwerte wurden mit Trypanblau-Lösung bestimmt.

nachzuweisendes Protein	Erstantikörper (1:1000 Verdünnung)	Zweitantikörper (1: 10 000 Verdünnung)
pERK1/2	Kaninchen Antiphospho-ERK1/2-Antikörper (NEB)	Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Maus
pJNK1/2	Kaninchen Antiphospho-JNK1/2-Antikörper (NEB)	Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Maus
pp38	Kaninchen Antiphospho-p38-Antikörper (NEB)	Meerrettichperoxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG aus der Maus

**Tab. 11**

Für Direkt-ELISA benutzte Antikörper.

### EGFP-hMR- und EGFP-ELISA

HEK-Zellen wurden mit Polyfect und entweder pEGFP-C1 oder pEGFP-C1-hMR transient transfiziert und 24 h später in serumfreiem Medium ruhiggestellt. Nach zusätzlichen 48 h wurde die Expression mit einem anti-GFP Antikörper J1-8 (Clontech) und Meerrettichperoxidase-gekoppeltem anti-Maus Antikörper in einem Direkt-ELISA (s.o.) bestimmt. Als Negativkontrolle wurden pcDNA3-transfizierte Zellen benutzt. Bei der Analyse des Abbaus des EGFP-hMR wurden die Experimente in Anwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (10 µmol/l) durchgeführt, um eine Neusynthese von Proteinen zu unterbinden.

### Fibronectin-ELISA

Zur Bestimmung des Fibronectins wurden Zellen mit 0,1% Triton lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Medien wurden mit Vollers Buffer (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> ad 100 ml Seralwasser) in Immunosorb-Streifen über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung (PBS/0,05% Tween20) wurde mit 2% BSA in PBS/0,05% Tween20 für 2 h geblockt. Inkubation mit dem Fibronectin-Antikörper (1:1000, Biotrend) erfolgte in der Blocking Solution. Nach erneut dreimaligem Waschen wurde mit anti-Kaninchen-Peroxidase-Antikörper in Blocking Solution für 1 h inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen und dann mit Meerrettichperoxidase-Substrat für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung der OD erfolgte vor und nach Zugabe von 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 490 nm in einem Multiwell Multilabel Counter.

### EGFR-Sandwich-ELISA

Für die Quantifizierung der EGFR-Expression in Geweben oder Zellen wurde ein Sandwich-ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) eingesetzt. Die Gewebe wurden hierzu mit 20 Stößen in einem Homogenisator (Janke&Kunkel, Staufen, Deutschland) bei 4° C in Cell Extraction Buffer (10 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 EGTA; 1 mM NaF; 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>; 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1% Triton X-100; 10% Glycerol; 0,1% SDS; 0,5% Deoxycholat; Proteasen-Inhibitor-Cocktail 1/1000) homogenisiert und ihr Proteingehalt mit dem BCA-Reagenz bestimmt. Vertiefungen, die mit Ziegen-anti-EGFR-Antikörper (= capture antibody) beschichtet waren, wurden für 2 h mit Gewebeproben oder EGFR-Standards inkubiert. Nach drei Waschschritten mit 0,05% Tween20 in PBS wurde ein biotinylierter anti-EGFR-Antikörper (= detection antibody) für 2 h hinzugegeben. Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen und dann mit einer Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung, die für 20 min hinzugefügt wurde, inkubiert. Nach Abwaschen der Lösung wurde das Substrat für die Meerrettichperoxidase hinzugefügt (0,5 mg/ml O-Phenylendiamin; 11,8 mg/ml Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O; 7,3 mg/ml Zitronensäure; 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Die Reaktion wurde nach 20 min mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die OD bei 490 nm in einem Multiwell Multilabel Reader gemessen. Aus der Kalibrierungskurve der EGFR Standards und den gemessenen Proteinwerten wurde der EGFR-Gehalt pro mg Gewebeprotein errechnet.

### **2.4.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zellysate, die mit Laemmli Puffer gemischt und bei 95° C für 5 min erhitzt worden waren, wurden durch SDS-PAGE mit Minigelen aufgetrennt. Hierbei wurden je nach Größe des gesuchten Proteins 8-12%ige Polyacrylamid-Trenngele verwendet, denen ein 3%iges Sammelgel vorgeschaltet war. Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (25 mM Tris; 3,5 mM SDS; 192 mM Glycin in Wasser) durchgeführt.

### Western Blot

Für den Western Blot erfolgte der Transfer auf Nitrozellulose nach der Semi-dry Methode mit 20% MeOH, 25 mM TRIS, 192 mM Glycin als Transferpuffer. Die Nitrozellulose wurde dann für 1-2 h in Blocking Solution (5% fettfreies Milchpulver und 0,1% Tween20 in PBS) inkubiert, einmal in PBS/Tween20 (0,05%) gewaschen und dann mit jeweiligem Erstantikörper über Nacht bei 4° C unter Schütteln in Antikörperverdünnungslösung (5% BSA in PBS + 0.05% Tween20) inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut mit Blocking Solution und mit PBS/Tween20 (0,05%) gewaschen und dann für 2 h mit Meerrettichperoxidase-gekoppeltem IgG als

Zweitantikörper in Antikörperverdünnungslösung inkubiert. Nach weiteren Waschschrinen in Blocking Solution, PBS/Tween20 (0,05%), PBS und destilliertem Wasser erfolgte die Detektion durch Chemilumineszenz mit dem ECL-Reagenz von Amersham.

Erstantikörper	Verdünnung	Firma
Kaninchen anti-phospho-ERK1/2	1:1000	New England Biolabs
Kaninchen anti-ERK1/2	1:1000	New England Biolabs
Kaninchen anti-EGFR (sc-03)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Ziege anti-MR	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen anti-Fibronectin	1:1000	Biotrend
Maus anti-EGFP (Jl-8)	1:2500	BD Clontech
Kaninchen anti-phospho-JNK1/2	1:1000	New England Biolabs
Kaninchen anti-phospho-EGFR(#2234)	1:1000	New England Biolabs
Kaninchen anti-phospho-c-Src	1:1000	New England Biolabs
Maus anti-pTyr	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Kaninchen anti-GFP	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

**Tab. 12**

Für Western Blot verwendete Erstantikörper mit ihren Verdünnungen.

Zweitantikörper (HRP-gekoppelt)	Verdünnung	Firma
Anti-Kaninchen IgG	1: 25 000	Rockland
Anti-Maus IgG	1:1500	Rockland
Anti-Ziege IgG	1:25 000	Rockland

**Tab. 13**

Für Western Blot verwendete Zweitantikörper mit ihren Verdünnungen.

### Commassie-Blau-Färbung

Gele wurden in Coomassie-Färbelösung (425 ml Ethanol; 50 ml Methanol; 100 ml Essigsäure; 425 ml H<sub>2</sub>O; 2 g Coomassie R250) für 30 min geschwenkt bis Banden sichtbar wurden. Danach wurden die Gele in Entfärber gelegt (200 ml Methanol; 75 ml Essigsäure; 725 ml H<sub>2</sub>O).

### Silberfärbung nach Heukeshoven

Gele wurden 30 min mit Imprägnierlösung (0,12% (w/v) AgNO<sub>3</sub> in Aqua bidest) inkubiert und dreimal für 10 sek mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Gele in Entwicklerlösung (2,1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v); 54 µl 30% Formaldehydlösung ad 100 ml Aqua bidest) ca. 10-15 min geschwenkt bis die gewünschte Farbintensität erreicht wurde. Zur Reduktion des Hintergrundes wurden die Gele einige Sekunden in Abschwächerlösung (100 ml Fotofixierer (Tetanal Superfix) 1:8 verdünnt; 100 µl 10%igen Farmerschen Abschwächer (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) getaucht und dann intensiv gewaschen.

### **2.4.7. Immunfluoreszenz**

Zellen wurden mit 4% Formaldehyd für 15 min fixiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,5% Triton X-100 (in PBS) permeabilisiert. Danach wurde für jeweils 10 Minuten mit 1% SDS (in PBS) und 100 mmol/l Glycin (in PBS) gewaschen und für 20 Minuten mit 10% Serum und 1% BSA (in PBS) geblockt. Es folgte eine 60minütige Inkubation mit anti-EGFR in Blockierlösung, der sich nach dreimaligem Waschen mit PBS eine 45minütige Inkubation mit Cy3-gekoppeltem Zweitantikörper anschloß. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Einbettung in Mounting Medium und die Auswertung mit einem inversen Mikroskop (Zeiss IM 35) und einer ICCD Kamera (Hamamatsu, Herrsching, Deutschland).

### **2.4.8. Immunopräzipitation / Koimmunopräzipitation**

Für die Immunopräzipitation wurden Zellysate mit Le-Moellic-RIPA-Puffer hergestellt Das Lysat wurde über Nacht bei 4° C mit anti-EGFP-Antikörper (Santa Cruz, 1:40 verdünnt) geschüttelt und dann mit 20 µl Protein A/G-Agarose erneut über Nacht bei 4° C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach 10 min Zentrifugation bei 10 000 rpm und 4° C abgenommen und mit 40 µl SDS-Proben Puffer (Red Mix) gemischt. Die Auftrennung der Proteine, der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Detektion erfolgte wie beim Western Blot beschrieben. Als Erstantikörper wurde der anti-EGFP-Antikörper J1-8 (BD Clontech 1:2500) und als Zweitantikörper Meerrettichperoxidasegekoppeltes anti-Maus-IgG verwendet.

Für die Koimmunopräzipitationsexperimente wurde auch eine anti-EGFP-MR-Immunopräzipitation wie gerade beschrieben durchgeführt, nur dass der Erstantikörper bei der Detektion auf der Nitrozellulosemembran gegen das vermutlich MR-assoziierte Protein gerichtet war.

## 2.5. Chromatinimmunopräzipitation

Transfizierte HEK-Zellen in 100x20 mm Petrischalen wurden mit 1% Formaldehyd für 10 min bei 37° C inkubiert, um eine Quervernetzung von Proteinen mit in der Nähe befindlicher DNA und mit anderen Proteinen zu erreichen. Es wurden danach Zelllysate in SDS-Lysepuffer (1% SDS; 10 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,1) hergestellt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Fragmentierung der DNA durch 25 Ultraschallpulse à 40 sek zwischen denen immer wieder auf Eis gekühlt und zentrifugiert wurde. Die Probe wurde anschließend 10 min bei 13 000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand, der DNA-Fragmente mit daran gebundenen Proteinen enthalten sollte, wurde in CHIP Dilution Buffer (0,01% SDS; 1,1% Triton X-100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris pH 8,1; 167 mM NaCl) 1:10 verdünnt und dann mit Protein A/G-Agase für 30 min bei 4° C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit anti-EGFP (sc-8334 Santa Cruz) 1:40 über Nacht im Kühlschrank unter Schütteln inkubiert. Im Anschluß daran wurde für 12-24 h mit Protein A/G Agarose im Kühlschrank unter Schütteln inkubiert. Die Protein A/G-Agarose, die die anti-EGFP Antikörper mit dem EGFP-hMR bindet und damit ausfällt, wurde durch 10 min Zentrifugation bei 10 000 rpm und 4° C pelletiert und mit low salt immune complex wash buffer (0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 150 mM NaCl), high salt immune complex wash buffer (0,1% SDS; 1% Triton X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl pH 8,1; 500 mM NaCl), LiCl immune complex wash buffer (0,25 M LiCl; 1% Nonidet P 40; 1% Desoxycholat; 1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,1) und zweimal mit TE-Puffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurden die Pellets mit 250 µl Elutions Buffer (1% SDS mit 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt, um die Protein-DNA-Komplexe abzulösen. Diese Prozedur wurde wiederholt und die Überstände mit 20 µl 5 M NaCl für 4 h bei 65° C in einem Heizblock inkubiert, um die Quervernetzung zwischen Proteinen und DNA aufzuheben. Es folgte ein Proteinverdau für 1 h bei 45° C nach Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris-HCl pH 6,5 und 2 µl 10 mg/ml Proteinase K. Die DNA-Fragmente wurden mit einer Phenol-Extraktion mit nachfolgender Ethanol-fällung isoliert und auf das Vorhandensein von EGFR-Promotor-Fragmenten mittels PCR untersucht. Die hierfür verwendeten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Sequenz	Primerpaare	Name
5'-AGG TGC CAG AAC ATT TCT CTA-3'	Sense 1	pGRE-SEAP sense
5'-AAC ACG CAG ATG CAG TCG-3'	Antisense 1	pGRE-SEAP anti
5'-CTCCACGGCTGTTTGTGTC-3'	Sense 2	3EGFRPfor1
5'-TAG AGC CAG CGT CGG ATA AT-3'	Antisense 2	EGFRP3-anti
5-GCCCCTCTCGGAAATTA ACTC-3'	Sense 3	hEGFRPfor2
5'-CGGCTCTCCCGATCAATAC-3'	Antisense 3	3EGFRPback2
5'-GGA CCC TCG GAC TTT AGA GC-3'	Sense 4	EGFRP3-sense
5'-AGG AGC AGA GGA GGA GGA GA-3'	Antisense 4	EGFRP4-anti

**Tab. 14**

Primer für die Detektion von EGFR-Promotor nach Chromatinimmunopräzipitation.

## 2.6. Calciummessungen

Die Konzentration an freiem zytosolischem Calcium wurde mit dem  $\text{Ca}^{++}$ -sensitiven Farbstoff Fura-2 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) ermittelt. Mit einem inversen Axiovert 100 TV Mikroskop (x400 Vergrößerung, Ölimmersion, Zeiss, Oberkochen, Deutschland; automatischer Filterwechsler von Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) wurde das Fluoreszenzsignal bei 510 nm gemessen, wobei die Anregungswellenlängen 334 und 380 nm betragen (100 W Xenonlampe). Es wurde der Quotient aus  $\text{Fluoreszenz}_{340\text{nm}}/\text{Fluoreszenz}_{380\text{nm}}$  alle 2 sek bestimmt, aus dem nach Abzug des Leerwertes mit einem Algorithmus von Grynkiewicz die intrazelluläre Calciumionenkonzentration errechnet wurde ( $K_d = 225 \text{ nmol/l}$ )<sup>(344)</sup>. Kontroll-Ringer-Lösung bestand aus (mmol/l): 130 NaCl; 5,4 KCl; 1  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 10 HEPES; 5 g Glukose mit pH 7,4 bei 37 °C.

Mangan gelangt über Calciumkanäle in die Zelle und kann wie  $\text{Ca}^{++}$  an Fura-2 binden. Bei Anregung mit 360 nm, der Wellenlänge, bei der die Fluoreszenz unabhängig von der  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration ist, kommt es mit  $\text{Mn}^{++}$  zu einer Abnahme des messbaren Signals (mangan quench). Mit dem Manganquench kann daher gezeigt werden, ob ein  $\text{Ca}^{++}$ -Einstrom über die  $\text{Ca}^{++}$ -Kanäle der Zellmembran ausgelöst wird.

## 2.7. EGFP-Fluoreszenz

Die Zellen wurden auf Glaträgern angesät und mit einem inversen Mikroskop (IM 35 Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit x40 und x100 Fluoreszenzobjektiven analysiert. Für die



Anfertigung von Bildern wurde eine ICCD Kamera (Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) benutzt.

## **2.8. Tierexperimentelle Untersuchungen**

Für die in vivo Untersuchungen wurden männliche Munich-Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 200-350 g verwendet. Nach Narkose mit NarcorenR wurde über zwei lumbodorsale Schnitte eine Adrenalektomie durchgeführt und den Tieren eine osmotische Minipumpe (Model 2ML1, Alzet, Paolo Alto, CA) implantiert, die entweder Aldosteron (36 µg/100 g Körpergewicht/Tag), Vehikellösung oder Dexamethason freisetzte. Bei Kontrolltieren wurde eine entsprechende Operation ohne Organentnahme durchgeführt. Im Anschluß daran wurden die adrenalektomierten Tiere mit standardisiertem Rattenfutter gehalten. Als Kontrolle für eine gelungene Adrenalektomie und effektive Pumpentätigkeit wurde bei den Ratten der Plasma-Aldosteronspiegel und der Plasma-Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Quotient bestimmt. Am 6. postoperativen Tag wurden die Tiere mit Inaktin (120 mg/kg Körpergewicht, Byk-Gulden, Konstanz, Deutschland) narkotisiert, die Organe wurden entnommen und sofort bei -70° C tiefgefroren. Die entnommenen Gewebe wurden mit 20 Stößen in einem Homogenisator (Janke & Kunkel Staufen, Deutschland) bei 4° C homogenisiert.

## **2.9. Transmonolayer Experimente**

### **2.9.1. Bestimmung des Kurzschlussstroms und des transepithelialen Widerstandes**

Um den Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) und den transepithelialen Widerstand ( $R_{te}$ ) in einem Zellmonolayer zu messen, wurden C7-Zellen auf 4,9 cm<sup>2</sup> permeablen Filtern (Falcon, Heidelberg, Deutschland) in 6-well-Schalen angesät. Das Messen des transepithelialen Widerstandes und der transepithelialen Potentialdifferenzen wurde mit einem Voltohmmeter-System (EVOM, WPI, Sarastoa, Fl) unmittelbar nach Entnahme der Zellen aus dem Brutschrank durchgeführt. Hierbei kam es nur zu einer leichten Abnahme der Temperatur auf 32-36° C und des pH-Wertes auf ca. 7,3. Der Widerstand, der durch die Filter alleine erzeugt wird, wurde ebenfalls gemessen und von den Werten der Monolayer abgezogen. Der Kurzschlussstrom wurde nach dem Ohmschen Gesetz aus  $PD_{te}/R_{te}$  errechnet.

### **2.9.2. Zählung von Zelldomen**

Als zweite Methode, den transepithelialen resorptiven Transport zu bestimmen, wurde die Bildung von Zelldomen herangezogen. Zellen wurden hierfür in 24-well-Platten angesät, auf

denen jeweils 25 mm<sup>2</sup> große Areale markiert waren. Die Anzahl der Dome  $\geq 50 \mu\text{m}$  Durchmesser wurde jeweils in den markierten Arealen mit Hilfe eines Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gezählt.

## **2.10. Materialien**

UO126, Tyrphostin AG 1478, Compound 56, Proteasen-Inhibitor-Cocktail wurden von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen. Alle anderen Materialien stammten von Sigma-Aldrich, falls nicht anders angegeben.

## **2.11. Bioinformatik**

Für die Auswertung wurden verschiedene im Internet zur Verfügung stehende Datenbanken und Programme benutzt.

**Allgemein:** [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

**Genanalysen / -vergleiche:** [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

**Restriktion:** <http://tools.neb.com/NEBcutter2>

**Multiple alignment:** [www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)

**Genregulation:** [www.gene-regulation.com/pub/programs.html](http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html)

## **2.12. Statistik**

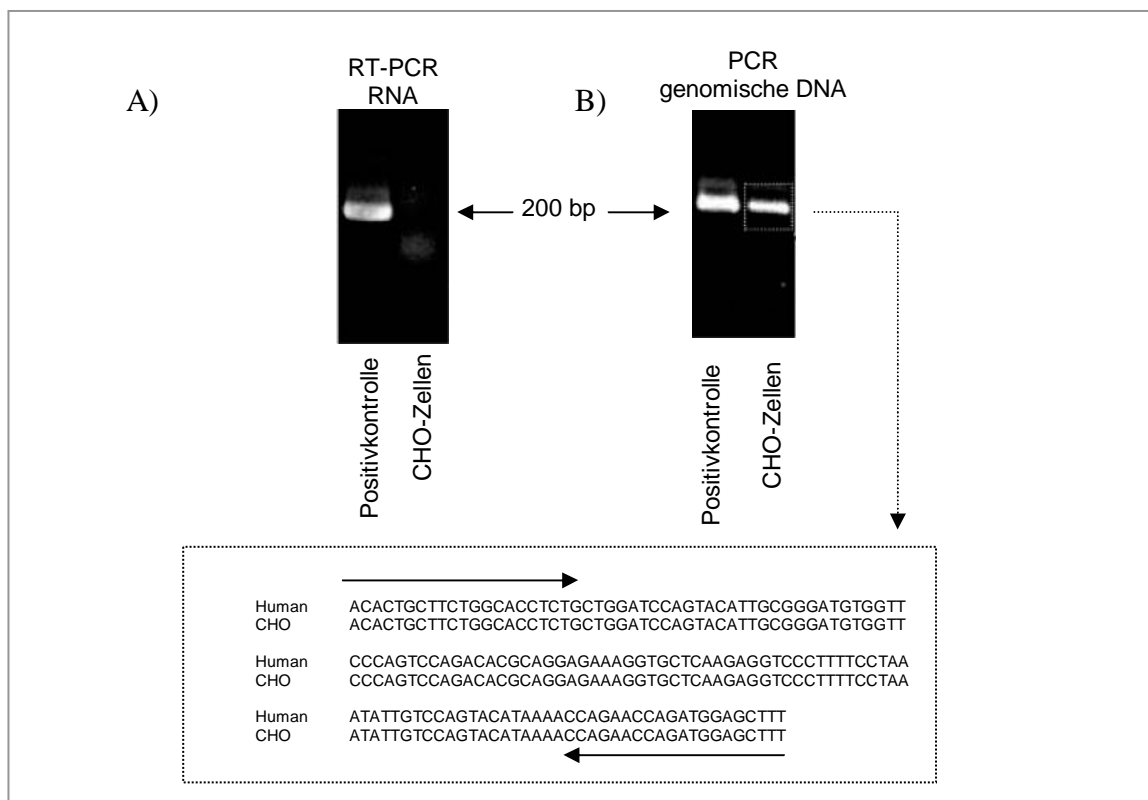
Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student-T-Test oder mit ANOVA getestet. Unterschiede wurde als signifikant gewertet bei  $p < 0,05$ .

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Aldosteron-induzierte EGFR-Expression

#### 3.1.1. CHO-Zellen

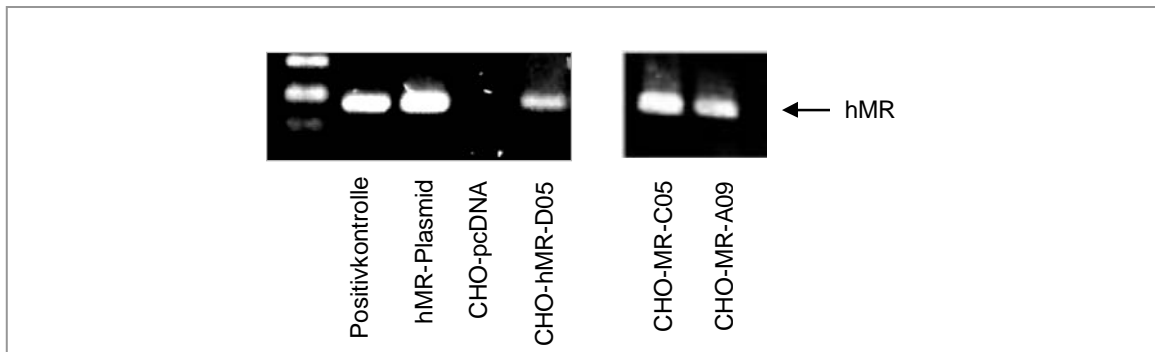
Um die Interaktion zwischen Aldosteron/MR und der EGFR-Signalkaskade *in vitro* zu untersuchen, wurden CHO-Zellen entweder mit einem Leervektor oder dem hMR stabil transfiziert. Bei CHO-Wildtyp-Zellen ließ sich der MR weder auf RNA-Ebene noch auf Proteinebene darstellen. Zum Nachweis, dass unsere Primer gegen den humanen MR prinzipiell auch für den chinesischen Hamster MR geeignet sind, führten wir eine PCR mit genomischer CHO-Zellen-DNA durch und sequenzierten das erhaltene DNA-Fragment anschließend. Hierbei ergab sich in dem untersuchten Abschnitt eine 100%ige Übereinstimmung mit der humanen MR-Sequenz (s. Abb. 7).



**Abb. 7**

- In CHO-Zellen ist mit RT-PCR kein MR nachweisbar (Positivkontrolle = mit hMR transfizierte CHO-Zellen).
- Die Primer aus A) ergeben bei einer PCR mit genomischer CHO-Zell-DNA eine Bande, deren Sequenz mit der vom hMR identisch ist.

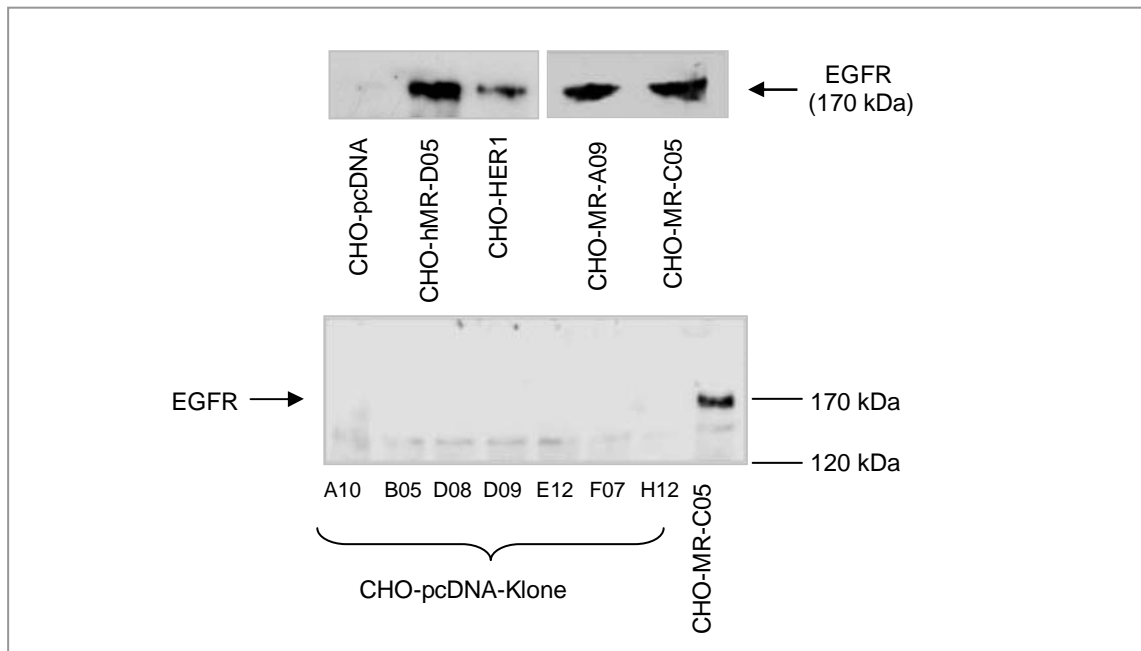
Die stabil mit hMR transfizierten Zellklone wurden durch RT-PCR auf hMR-mRNA-Expression untersucht und es wurden drei Klone mit guter hMR-Expression ausgewählt. Mit dem Leervektor pcDNA transfizierte Zellen exprimierten keinen MR.



**Abb. 8**

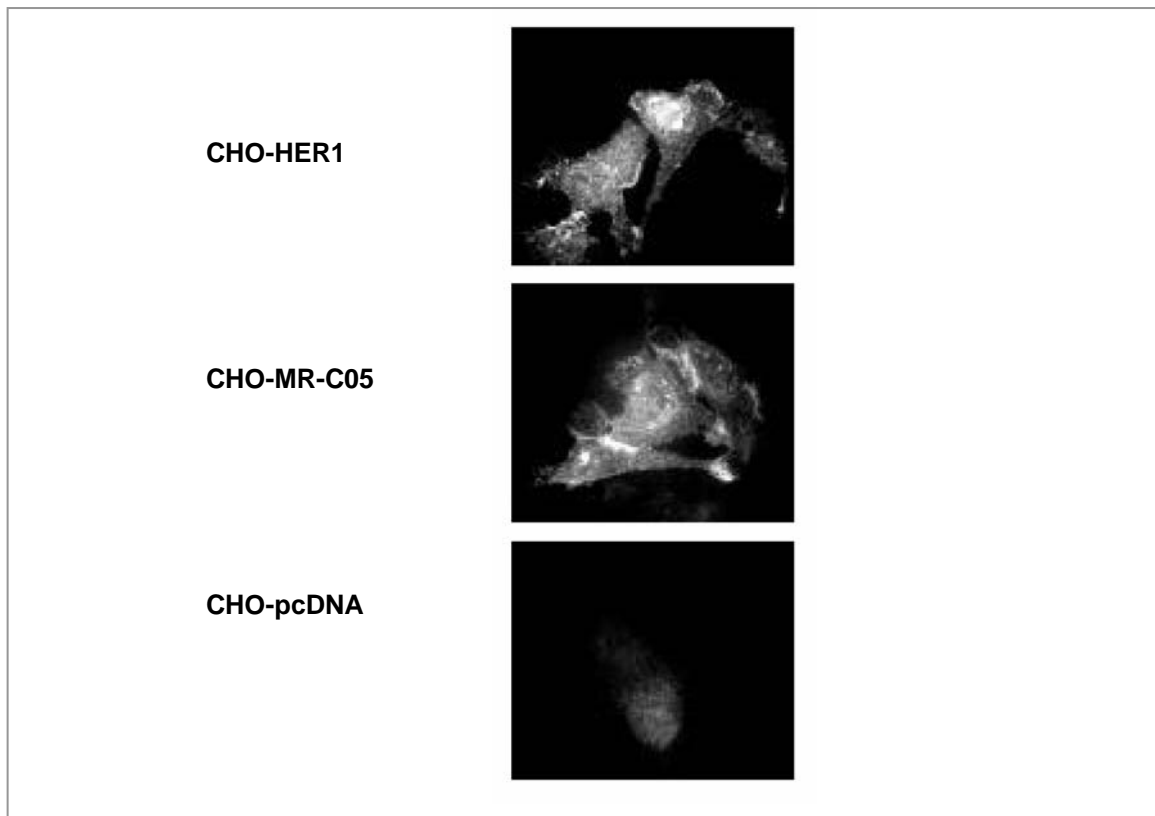
Nachweis des hMR in den CHO-hMR-Klonen (Positivkontrolle = hMR-Plasmid), aber nicht im CHO-pcDNA-Klon (= Negativkontrolle).

Anschließend wurden die Klone auf EGFR-Protein-Expression im Western Blot untersucht. Während in den CHO-pcDNA-Klonen kein EGFR nachweisbar war, besaßen die CHO-MR-Klone eine deutliche Bande in dem erwarteten Bereich von 170 kDa. Diese lag auf derselben Höhe wie die Bande von EGFR- (= HER1-) transfizierten CHO-Zellen.



**Abb. 9**

CHO-MR-Klone exprimieren den EGFR, während er bei CHO-pcDNA-Klonen im Western Blot nicht nachweisbar ist (CHO-HER1 = stabil mit humanem EGFR transfizierte Zellen als Positivkontrolle).

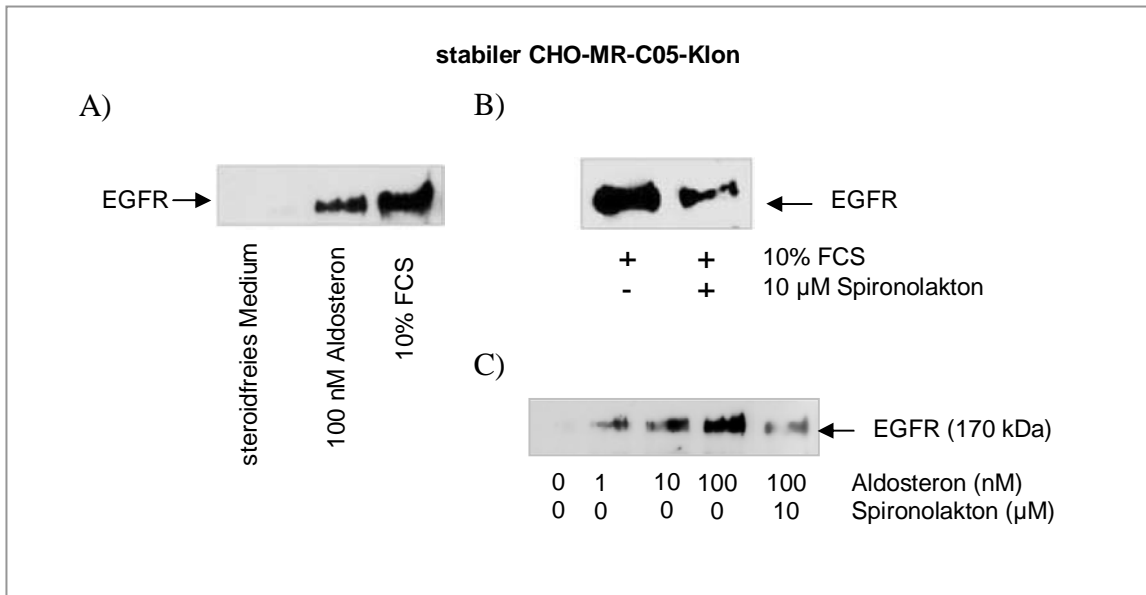


**Abb. 10**

Immunfluoreszenzuntersuchungen mit einem Antikörper gegen den EGFR zeigen eine vermehrte EGFR-Expression des CHO-MR-Klons-C05 im Vergleich zum CHO-pcDNA-Klon (CHO-HER1 = stabil mit humanem EGFR transfizierte CHO-Zellen).

Auch in der Immunfluoreszenz zeigte sich der Unterschied in der EGFR-Expression zwischen CHO-pcDNA-Zellen, die nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz aufwiesen und den MR-transfizierten Zellen, deren Fluoreszenzintensität der von CHO-HER1-Zellen ähnelte (s. Abb. 10).

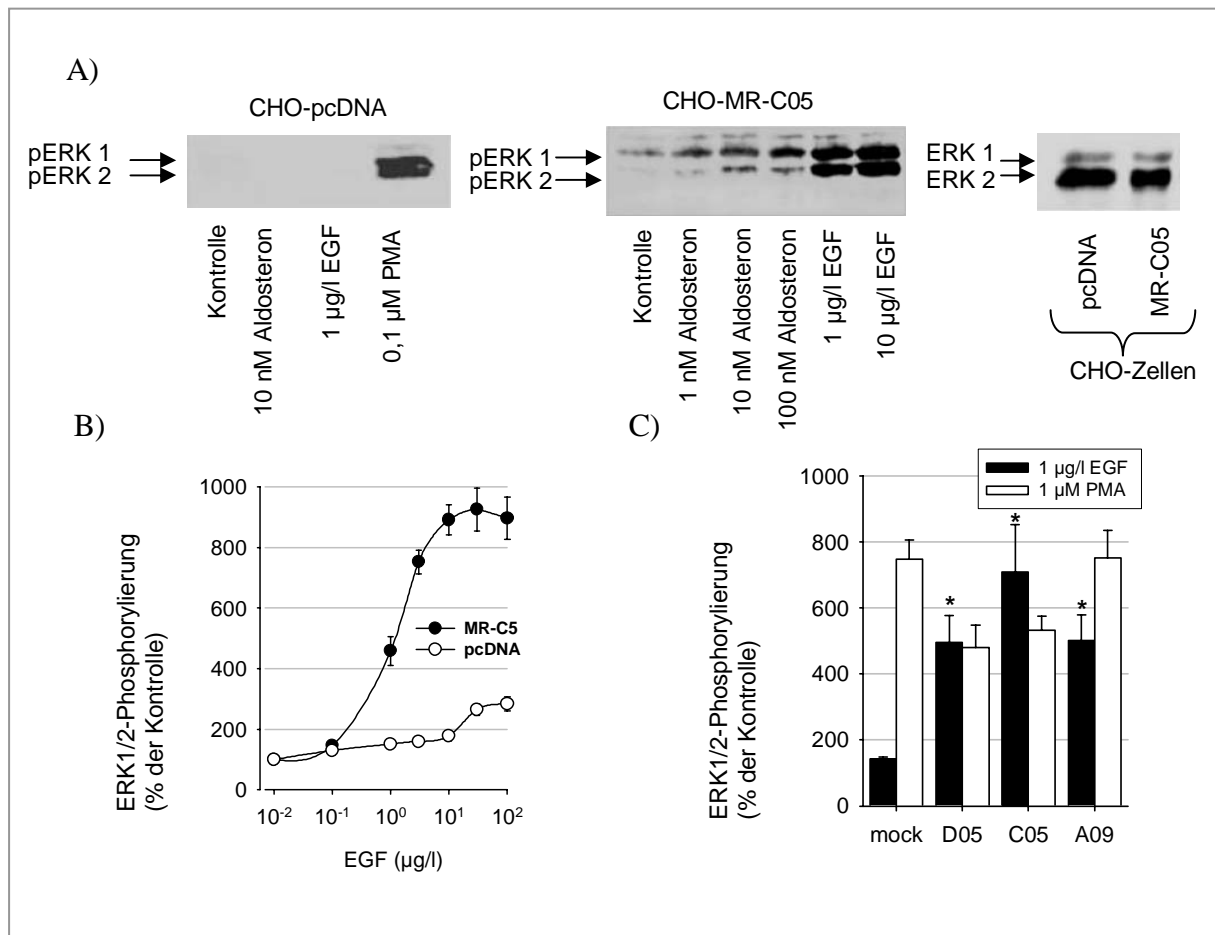
Da die bisherigen Zellen mit serum- und damit auch steroidhaltigem Medium kultiviert wurden, war von Interesse, ob der MR allein oder zusammen mit einem Liganden für die vermehrte EGFR-Expression notwendig sei. Beim Vergleich zwischen 48 h Inkubation des CHO-MR-C05-Klons in serumfreiem Medium, in Medium mit Aldosteron (100 nM) oder in Medium mit 10 % FCS zeigte sich nur in Anwesenheit von Steroiden eine EGFR-Bande im Western Blot. Durch zusätzliche Inkubation mit dem MR-Antagonisten Spironolakton ließ sich die EGFR-Expression in 10% FCS-Medium wieder verringern. Abb. 11 zeigt, dass die Aldosteronwirkung auf die EGFR-Expression dosisabhängig steigerbar war und auch durch Spironolakton gehemmt werden konnte. In unserem heterologen Expressionssystem war folglich eine Kombination aus Aldosteron und MR für die Induktion der EGFR-Expression erforderlich.



**Abb. 11**

- A) Die EGFR-Expression im CHO-MR-C05-Klon ist nach 72 h Inkubation in serumfreiem Medium aufgehoben, lässt sich aber durch 48 h Inkubation mit 100 nM Aldosteron oder 10% FCS wieder herstellen.
- B) Die gesteigerte EGFR-Expression im CHO-MR-C05-Klon in serumhaltigem Medium lässt sich durch Spironolaktion hemmen.
- C) Aldosteron führt dosisabhängig zu einer Steigerung der EGFR-Expression, die durch Spironolaktion inhibiert werden kann.

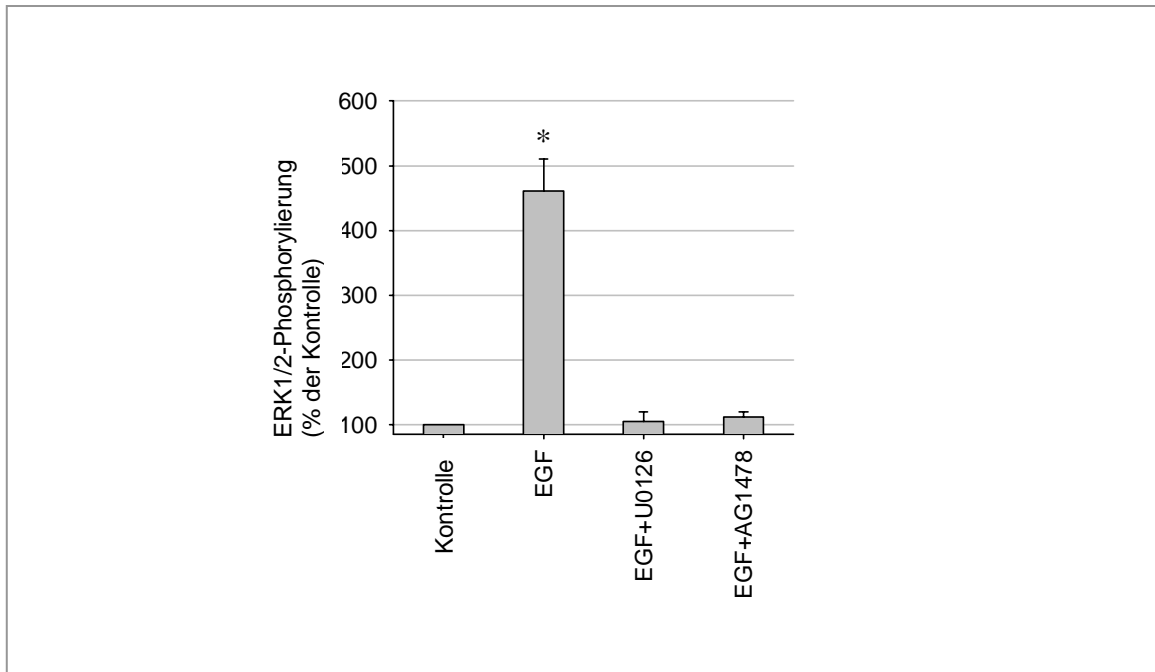
Als nächstes untersuchten wir, ob der EGFR funktionell intakt sei und die stromabwärts liegende Signalkaskade regelrecht ablaufen würde. Daher bestimmten wir die ERK-Aktivierung nach 5-minütiger Stimulation mit EGF. Als Positivkontrolle verwendeten wir PMA, das über eine Aktivierung der PKC unabhängig vom EGFR-Signaltransduktionsweg ebenfalls zu einer ERK1/2-Phosphorylierung führt (s. Abb. 12). Während es im CHO-MR-C05-Klon nach Stimulation mit EGF oder Aldosteron zu einer dosisabhängigen Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung kam, reagierten die CHO-pcDNA-Zellen weder auf EGF noch auf Aldosteron mit vermehrter ERK-Phosphorylierung. Eine generell gesteigerte ERK-Expression in CHO-MR-Klonen wurde durch Western Blot ausgeschlossen. Diese Daten ließen sich durch ELISA bestätigen und quantifizieren. Bei CHO-MR-C05 stieg die ERK-Phosphorylierung zwischen 0,1 und 10 μg/l EGF steil an (EC50-Wert =  $1,1 \pm 0,2$  μg/l EGF), während bei den CHO-pcDNA-Zellen bis 10 μg/l kein Anstieg der ERK-Phosphorylierung feststellbar war. Weitere untersuchte CHO-MR-Klone variierten in der EGF- und PMA-induzierten ERK-Phosphorylierung quantitativ etwas, zeigten aber stets eine deutlich Stimulierbarkeit.



**Abb. 12**

- A) Bei CHO-MR-C05- aber nicht bei CHO-pcDNA-Zellen kommt es nach 24 h Inkubation in serumfreiem Medium und 5 min Stimulation mit EGF oder Aldosteron zu einer vermehrten ERK-Phosphorylierung. Die ERK-Expression ist in CHO-MR-Zellen nicht gesteigert.
- B) Quantifizierung der EGF induzierten dosisabhängigen ERK-Phosphorylierung in CHO-MR-C05-Zellen im Vergleich zu CHO-pcDNA-Zellen.
- C) In verschiedenen CHO-MR-Klonen kommt es zu einer vergleichbaren EGF- und PMA-induzierte ERK-Phosphorylierung (n = 12, \* p < 0,05).

Diese Stimulierbarkeit ließ sich durch Hemmung von MEK durch UO126 oder durch AG1478, einem Inhibitor der EGFR-Tyrosinkinase, aufheben (s. Abb. 13). Dies bestätigte unsere Vermutung, dass die ERK1/2-Phosphorylierung über den EGFR-Signaltransduktionsweg zustande kommt. Der vermehrt exprimierte EGFR scheint also funktionell intakt zu sein und zu einer erhöhten Signaltransduktion zu führen.

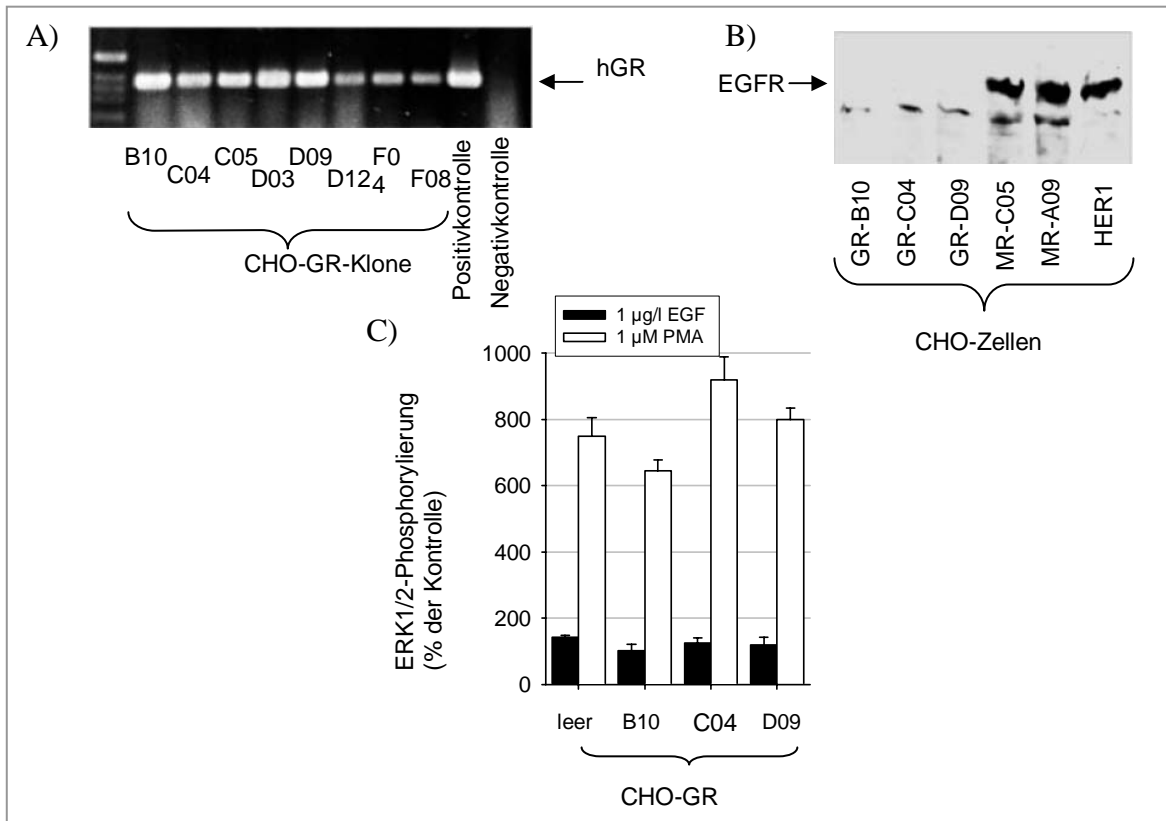


**Abb. 13**

Die EGF-induzierte ERK-Phosphorylierung in CHO-MR-Zellen kann durch den MEK-Inhibitor UO126 (10  $\mu$ M) und den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 (100 nM) gehemmt werden (n = 9, \* p < 0,05).

Zwischen MR und GR besteht eine starke Homologie und beide teilen sich klassischerweise ein HRE (hormon response element). Wir untersuchten daher, ob in stabil transfizierten CHO-GR-Klonen ebenfalls eine vermehrte EGFR-Expression zu beobachten sei (s. Abb. 14). Zuerst wurden die GR-mRNA-Expression der stabil transfizierten Zellen durch RT-PCR getestet. Die Klone mit GR-Überexpression wurden dann auf ihren EGFR-Gehalt im Western Blot untersucht, zeigten aber keine erhöhte Expression. Als Positivkontrolle wurden CHO-MR-Klone benutzt. Auch eine EGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung war nicht nachweisbar, während PMA die ERK-Phosphorylierung gut stimulierte. Bei der durch Aldosteron und MR hervorgerufenen EGFR-Expressions- und Signaltransduktionsstimulation handelt es sich daher um einen MR-spezifischen Effekt im Vergleich zum GR.

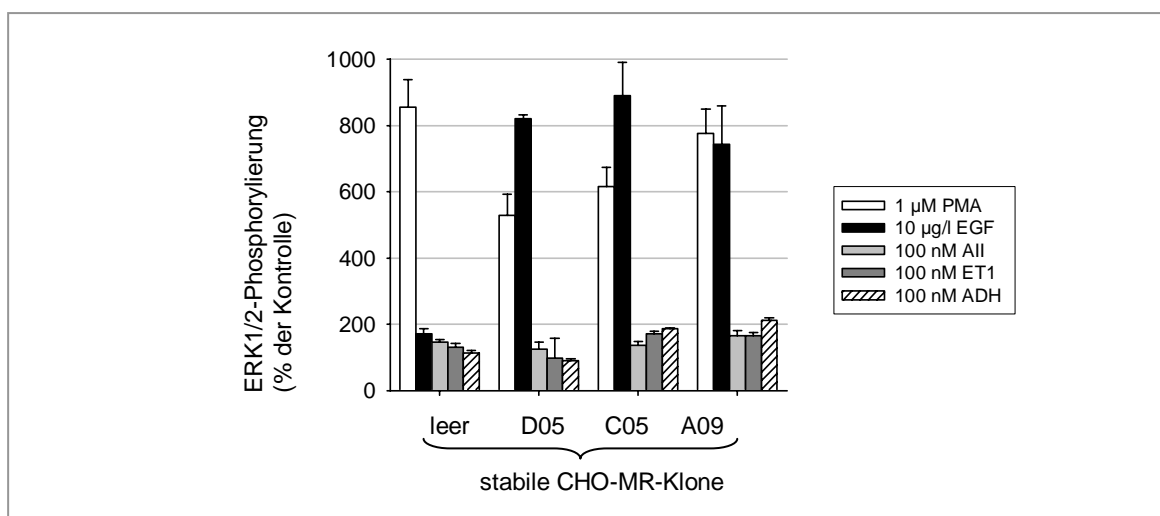




**Abb. 14**

- A) Durch RT-PCR lässt sich in stabil mit hGR transfizierten CHO-Zellen die hGR-Überexpression zeigen.
- B) Bei CHO-GR-Klonen ist im Western Blot kein EGFR nachweisbar.
- C) Bei CHO-GR-Klonen kann durch EGF keine gesteigerte ERK-Phosphorylierung ausgelöst werden (PMA = Positivkontrolle) (n = 9).

Ligandengebundener MR führte nicht zu einer generellen Hochregulation der Signaltransduktionswege von Peptidhormonen, denn die ERK-Phosphorylierung wurde nur durch EGF, nicht aber durch Angiotensin II, Endothelin-1 oder ADH stimuliert (s. Abb. 15).

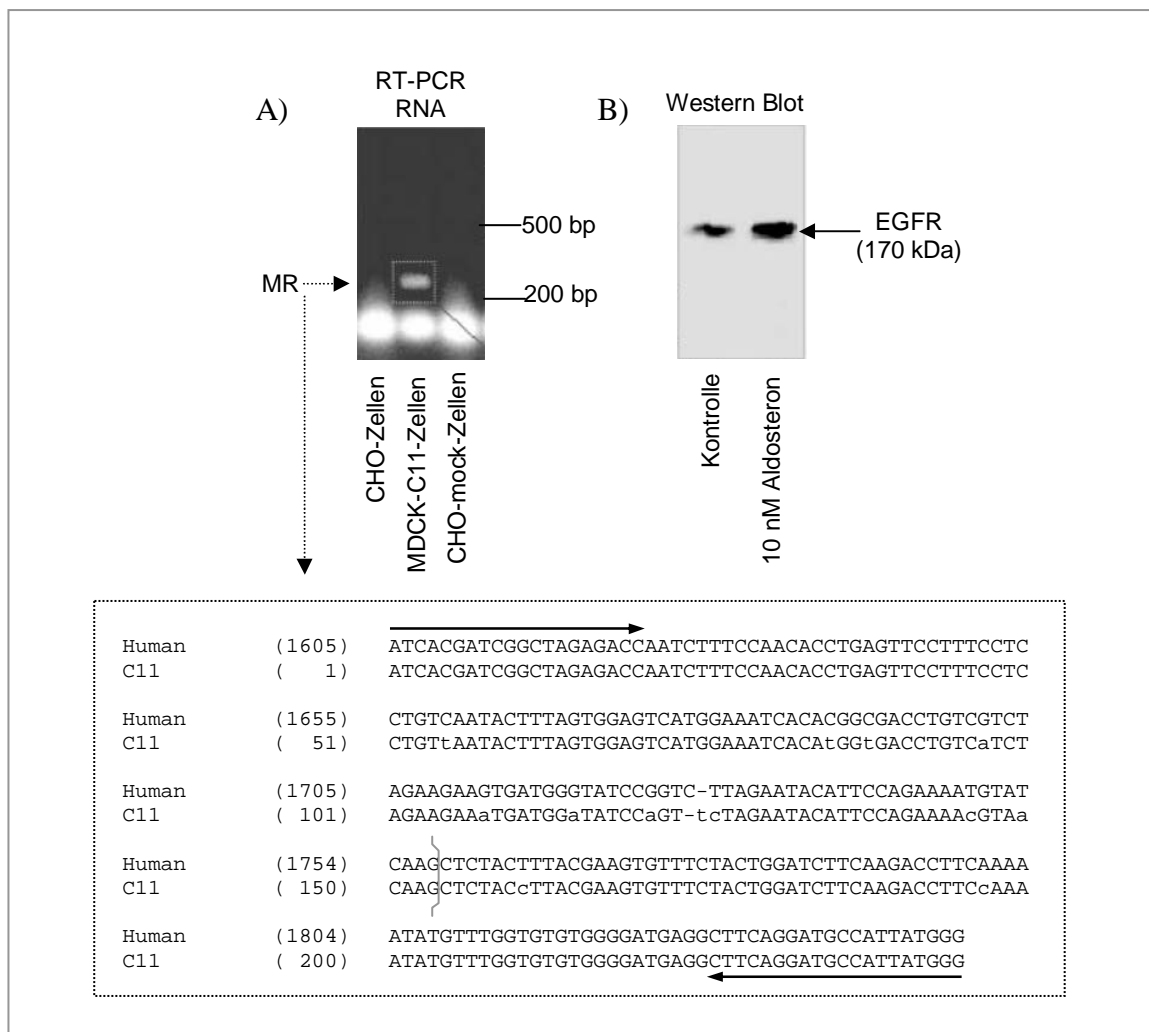


**Abb. 15**

Andere Peptidhormone wie Angiotensin II (AII), Endothelin-1 (ET1) oder Vasopressin (ADH) lösen in CHO-MR-Zellen keine vermehrte ERK-Phosphorylierung aus (n = 9).

### 3.1.2. MDCK-C11-Zellen

Wir untersuchten die im heterologen Expressionssystem durch Aldosteron/MR-induzierte EGFR-Expression anschließend auch in MDCK-C11-Zellen, die den MR endogen exprimieren. Wie Abbildung 15 zeigt, konnte der MR für C11-Zellen auf RT-PCR-Ebene durch Intron-überspannende Primer nachgewiesen werden. Die Identität wurde ferner durch Sequenzierung des erhaltenen PCR-Fragmentes bestätigt (95% Homologie zum hMR). Auch der EGFR wird endogen in MDCK-C11-Zellen exprimiert, ließ sich aber zusätzlich durch Inkubation für 72 h mit 10 nM Aldosteron induzieren.

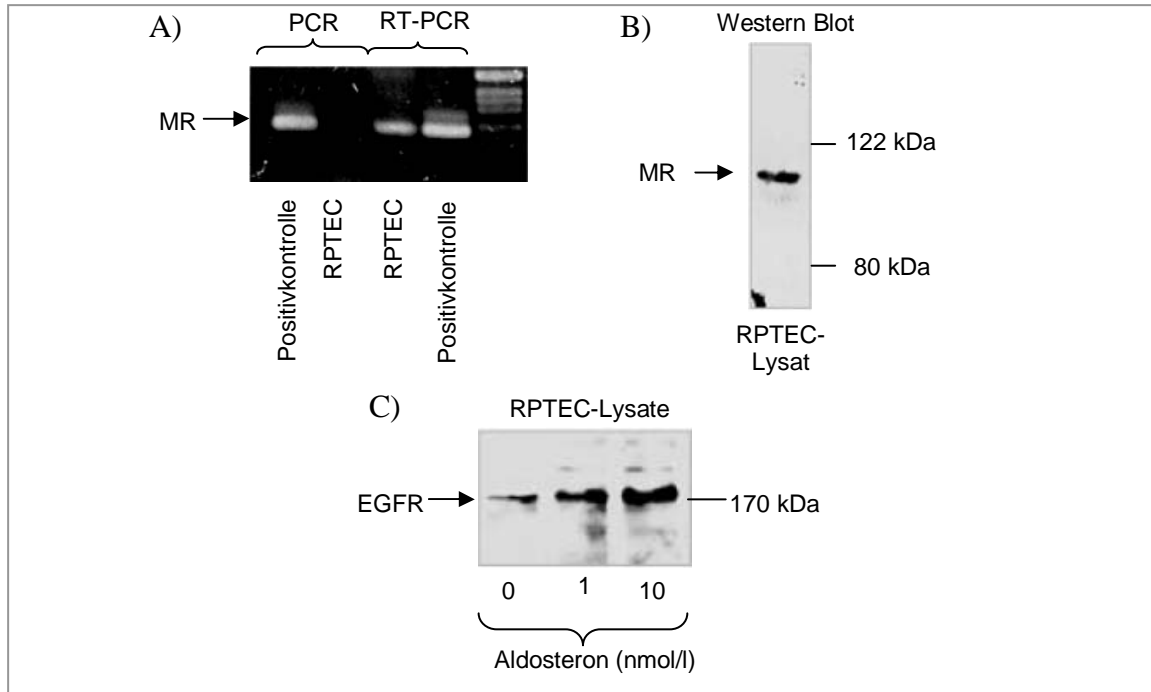


**Abb. 16**

- A) MDCK-C11-Zellen exprimieren den MR auf mRNA-Ebene endogen.  
 B) Der endogen in MDCK-C11-Zellen exprimierte EGFR wird durch 72 h Inkubation mit 10 nM Aldosteron verstärkt als Protein synthetisiert.

### 3.1.3. Primärzellen (RPTEC, HAoSMC)

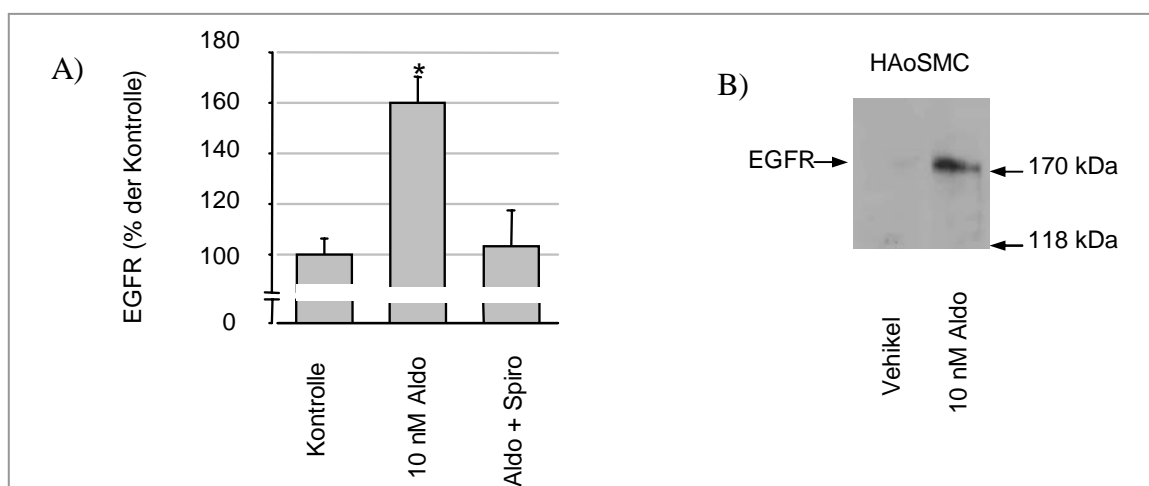
Auch in Primärzellen des proximalen Tubulusepithels (RPTEC), in denen der MR in Form von mRNA und Protein nachweisbar ist, konnte durch Inkubation mit 1 und 10 nM Aldosteron die EGFR-Protein-Expression gesteigert werden (s. Abb. 17).



**Abb. 17**

In renalen proximalen Tubuluszellen (RPTEC) ist der MR in der RT-PCR A) und im Western Blot B) nachweisbar und lässt sich durch 72-h-Inkubation mit Aldosteron induzieren (n = 3) C).

Ebenso konnte in humanen aortalen Gefäßmuskelzellen in Primärkultur durch 10 nM Aldosteron die EGFR-Expression induziert und durch 1  $\mu$ M Spironolakton gehemmt werden.

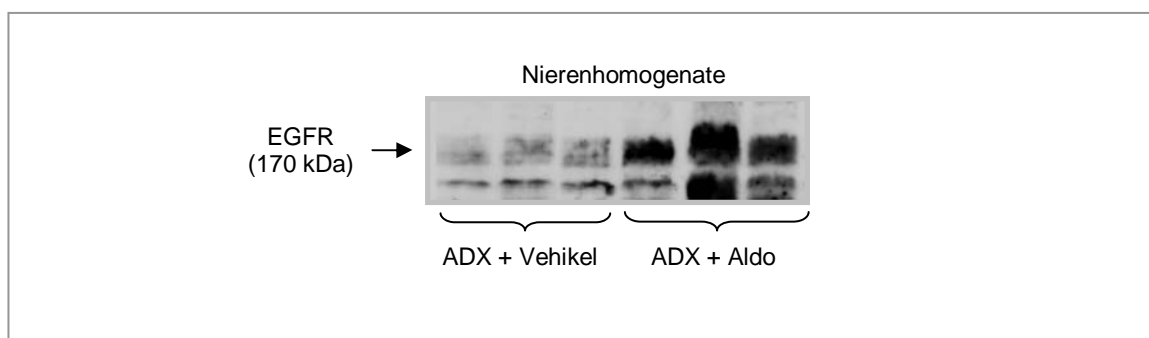


**Abb. 18**

In humanen aortalen glatten Gefäßmuskelzellen (HAoSMC) sieht man im ELISA A) (n= 8, \* p < 0,05) und im Western Blot B) einen Anstieg der EGFR-Expression nach Inkubation mit 10 nM Aldosteron. Durch Spironolakton (1  $\mu$ M) ist dieser Anstieg aufhebbar.

### 3.1.4. In-vivo-Versuche mit Wistar-Ratten

Um die Relevanz der bisher erhaltenen Ergebnisse für den lebenden Organismus zu prüfen, führten wir Untersuchungen an männlichen adrenaletomierten Munich-Wistar-Ratten durch. Diese wurden mit osmotischen Minipumpen versehen, die entweder Vehikellösung oder Aldosteron enthielten. Nach 5 Tagen wurden verschiedene Organe entnommen, u.a. die Nieren. Nierenrindenhomogenate wurden auf ihre EGFR-Expression untersucht. Hierbei zeigte die Gruppe mit Aldosteron im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich gesteigerte EGFR-Expression. Unsere in-vitro gewonnene Erkenntnis, dass Aldosteron zur EGFR-Expressionserhöhung führt, bestätigte sich im Tiermodell.

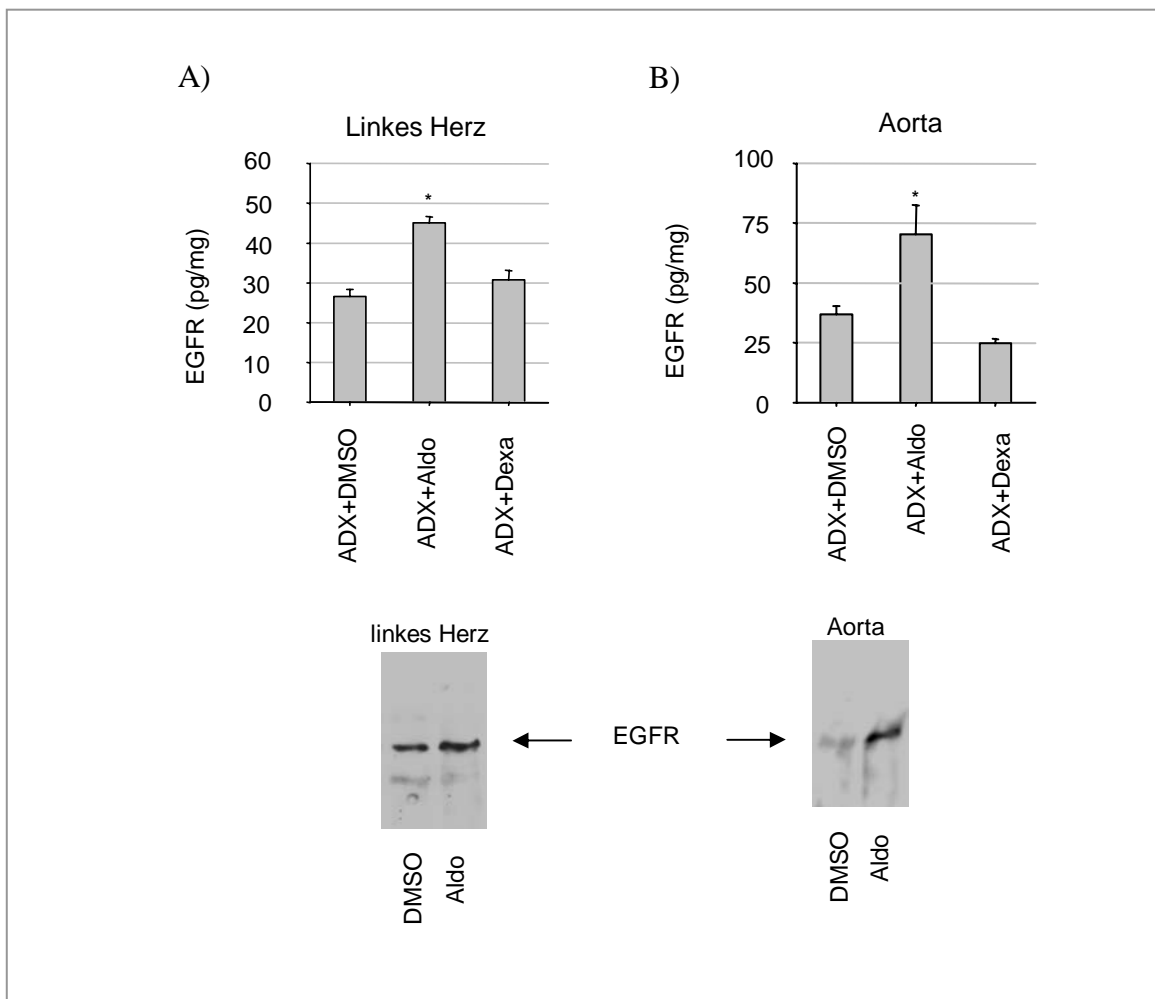


**Abb. 19**

In Nierenrindenhomogenaten von adrenaletomierten Ratten zeigt die Gruppe mit Aldosteron eine gesteigerte Expression des EGFR im Western Blot.

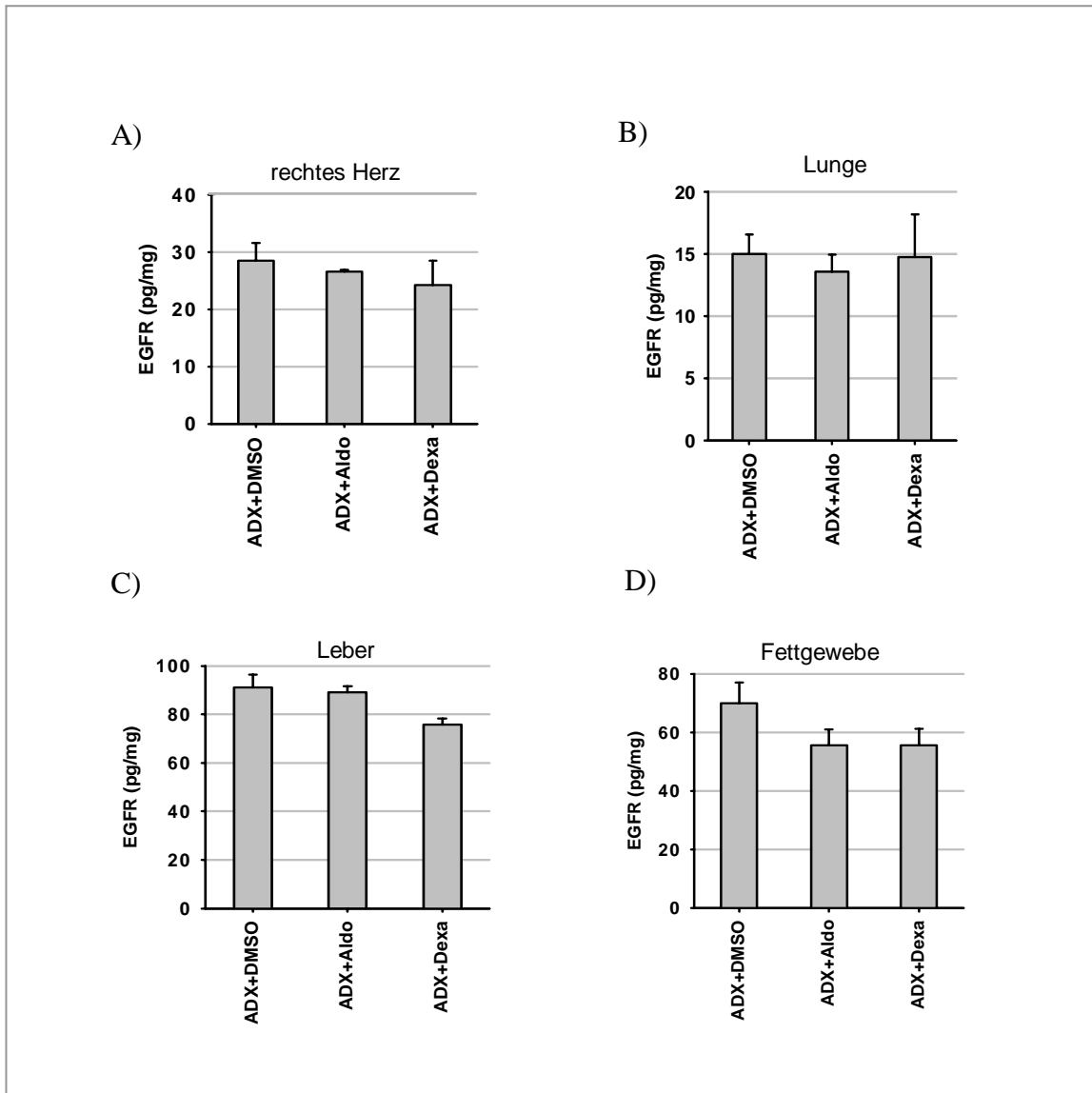
Da die pathologischen Effekte von Aldosteron aber neben der Niere auch wesentlich das Herz-Kreislaufsystem betreffen, interessierte uns, ob die Aldosteron-induzierte EGFR-Steigerung alle Organe oder nur bestimmte betrifft. In einer weiteren Versuchsreihe wurden daher adrenaletomierte Ratten entweder mit Aldosteron, Vehikellösung oder Dexamethason substituiert. Ihre EGFR-Expression in verschiedenen Organen wurde dann mit der von Kontrolltieren verglichen. Da Dexamethason in vivo praktisch ein ausschließlicher GR-Agonist ist, sollte hiermit die Rolle des GR und damit die Spezifität der EGFR-Expressionsveränderung getestet werden.

In den von uns untersuchten Geweben Herz, Aorta, Lunge, Leber und Fettgewebe zeigte sich im ELISA bzw. Western Blot nur im linken Herzen und in der Aorta eine Zunahme der EGFR-Expression unter Aldosterongabe. Dexamethason hatte in keinem der untersuchten Organe eine von der Kontrolle unterschiedlichen Effekt auf die EGFR-Expression (s. Abb.20). Die in unseren Untersuchungen mit vermehrter EGFR-Expression reagierenden Organe entsprechen den am empfindlichsten auf Aldosteron reagierenden Organen, die auch klinisch am besten auf MR-Antagonisten ansprechen.



**Abb. 20**

Im Sandwich-ELISA und im Western Blot weisen adrenaletomierte Ratten nach 5-tägiger kontinuierlicher Aldosteronapplikation (36 µg/100 g/d) einen erhöhten EGFR-Gehalt im linken Herzen A) und in der Aorta B) im Vergleich zu Kontrolltieren oder Dexamethason-infundierten Tieren (36 µg/100 g/d) auf (n = 6, \* p < 0,05).



**Abb. 21**

Adrenalektomierte Ratten mit 5-tägiger kontinuierlicher Vehikel-, Aldosteron- oder Dexamethasonapplikation weisen keine Unterschiede im EGFR-Gehalt im rechten Herzen A), in der Lunge B), in der Leber C) und im Fettgewebe D) auf (n = 6).

*Insgesamt konnte in verschiedenen Modellsystemen (heterologes CHO-Zellsystem, MDCK-Zellen, Primärkulturen, in vivo Rattenversuche) ein Anstieg der EGFR-Expression durch Aldosteron mit unterschiedlichen Methoden (Western Blot, Immunfluoreszenz, ELISA) gezeigt werden. Diese Interaktion ließ sich nur in Gegenwart des MR auslösen und war durch den MR-Antagonisten Spironolakton hemmbar. Die unter Aldosteroninkubation zusätzlich gebildeten EGFRs waren funktionell intakt und führten zu einer vermehrten ERK1/2-Phosphorylierung. Da es sich beim EGFR um einen möglichen Angriffspunkt für die Prävention von Aldosteron-induziertem Remodeling handeln könnte, untersuchten wir als nächstes den molekularen Mechanismus der Aldosteron-induzierten EGFR-Expression.*

## 3.2. Molekulare Grundlagen für Aldosteron-induzierte EGFR-Expression

### 3.2.1. Promotoruntersuchungen

Die in vitro und auch in vivo konstant nachweisbare vermehrte EGFR-Expression bei Aldosterongabe wäre am einfachsten durch eine erhöhte Promotoraktivität mit nachfolgend erhöhter EGFR-Expression zu erklären. Hierauf weisen auch Versuche mit Ratten hin, bei denen durch Mineralocorticoide eine Erhöhung und durch Spironolaktone eine Abnahme der EGFR-mRNA-Konzentration gemessen wurde<sup>(340;341;345)</sup>. Um diese Hypothese zu untersuchen, benutzten wir einen Reporter-Gen-Assay mit dem EGFR-Promotor (die 1118 bp stromaufwärts vom Startcodon liegenden Basenpaare) vor einer Luciferase. In MR-transfizierten CHO-Zellen in serumhaltigem Medium kam es zu einer vermehrten Reporteraktivität, die durch den GR nicht auslösbar und somit MR-spezifisch war (Abb. 22). Auch in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) kann durch Transfektion mit hMR ein Anstieg der Promotoraktivität gezeigt werden, der mit zunehmender Aldosteronkonzentration immer ausgeprägter wird. Ohne Aldosteron in serum- und steroidfreiem Medium gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen Zellen mit und ohne hMR. Zwischen 1 und 100 nM Aldosteron nimmt der Unterschied dosisabhängig zu (s. Abb. 22).

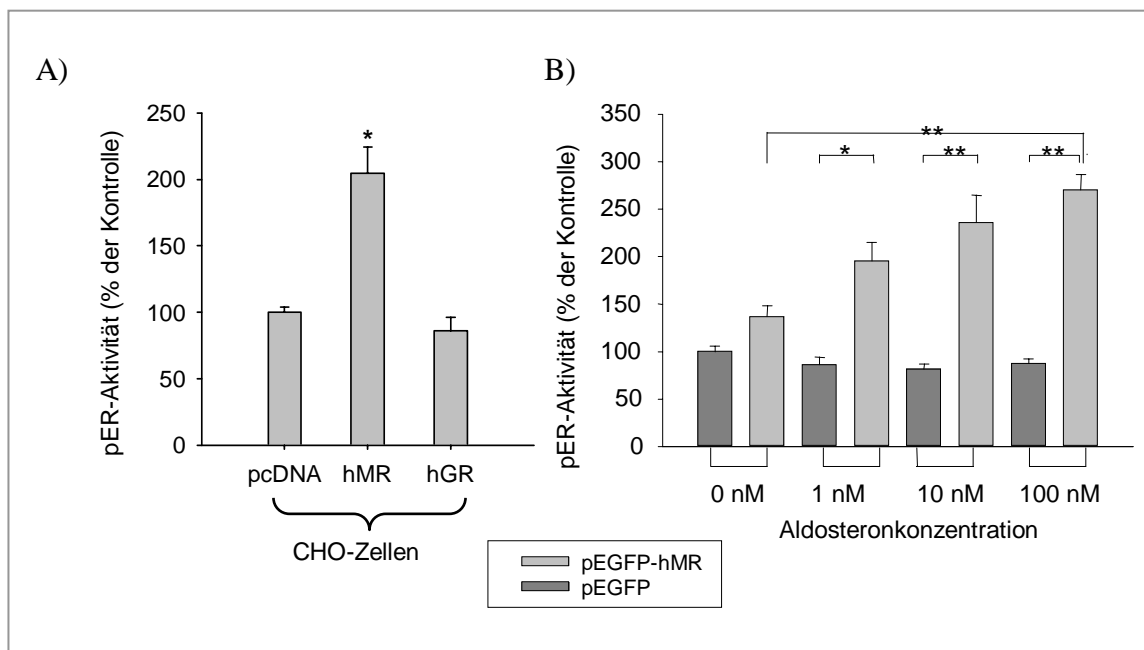
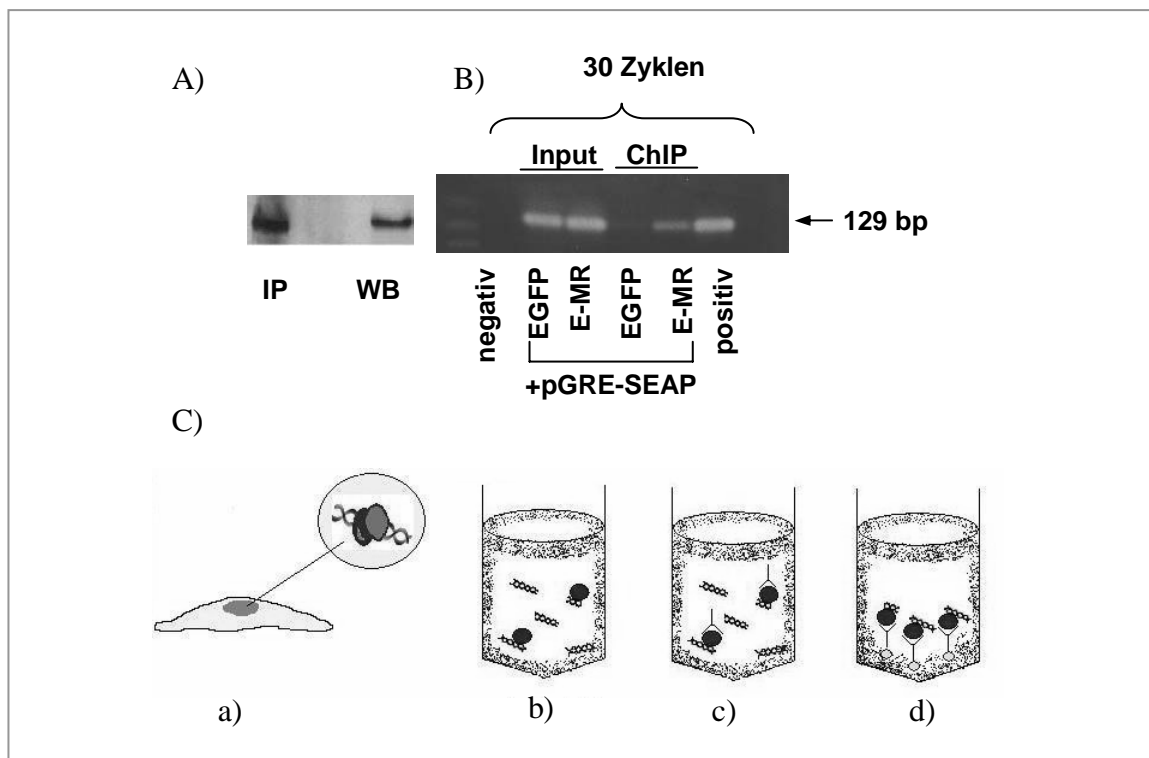


Abb. 22

- A) hMR-transfizierte-CHO-Zellen zeigen eine vermehrte EGFR-Promotoraktivität im Reporter-Gen-Assay als hGR-transfizierte ( $n = 6-12$ ,  $* p < 0,05$ ).
- B) HEK-Zellen zeigen bei Transfektion mit pEGFP-hMR eine dosisabhängige gesteigerte EGFR-Promotoraktivität bei 24 h Inkubation mit Aldosteron ( $n \geq 5$  hMR,  $n = 3$  EGFP,  $* p < 0,05$ ,  $** p < 0,01$ ).

### 3.2.2. Etablierung eines CHIP-Assays für den MR

Nachdem die Aldosteron-induzierte EGFR-Expression durch einen Effekt auf den EGFR-Promotor zustande zu kommen scheint, wollten wir durch Chromatinimmunopräzipitation klären, ob es sich um eine direkte oder eine indirekte Interaktion zwischen hMR und EGFR-Promotor handeln würde. Die Eignung unseres Antikörpers für eine Immunopräzipitation testeten wir an transient mit EGFP-hMR transfizierten HEK-Zellen. Positivkontrolle war ein Western Blot gegen den EGFP-hMR in HEK-Zellen. Der Chromatinimmunopräzipitationsassay wurde mit GRE-überexprimierenden HEK-Zellen, die zusätzlich entweder EGFP- oder EGFP-hMR-transfiziert waren, zunächst evaluiert. Nach Immunopräzipitation des EGFP/EGFP-hMRs wurde eine PCR gegen das GRE angeschlossen. Da nur bei EGFP-hMR-exprimierenden Zellen ein deutliches PCR-Signal vorhanden war, eignet sich unser Assay zur Messung einer direkten Bindung zwischen hMR und DNA (s. Abb. 23).



**Abb. 23**

- A) Immunopräzipitation (IP) des EGFP-hMR ist möglich (WB = Western Blot).
- B) Etablierung des Chromatinimmunopräzipitationsassays: Nachweis des GRE-SEAP durch PCR nach Chromatinimmunopräzipitation ist nur in EGFP-hMR und nicht in EGFP-transfizierten HEK-Zellen möglich.
- C) Schema der Chromatinimmunopräzipitation:
- DNA wird mit ihren DNA-Bindungsproteinen quervernetzt.
  - DNA mit gebundenen Proteinen wird durch Ultraschall in kleine Fragmente geteilt.
  - Antikörper gegen das vermutete Bindungsprotein werden hinzugefügt.
  - Durch Protein A/G-Agarose werden Komplexe aus Antikörper-Bindungsprotein-DNA präzipitiert. In dem Präzipitat wird die DNA-Proteinbindung gelöst. Anschließend kann durch PCR ein DNA-Fragment, das an das Bindungsprotein gebunden hat, nachgewiesen werden.



### 3.2.3. Nachweis der MR/EGFR-Promotor-Interaktion

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen EGFR-Promotor und hMR wurden in EGFP- oder EGFP-hMR-transfizierten HEK-Zellen nach Quervernetzung von Proteinen und DNA eine Immunopräzipitation des EGFPs bzw. EGFP-hMRs durchgeführt. Das Präzipitat wurde anschließend mit spezifischen Primern auf das Vorhandensein des EGFR-Promotors untersucht. Dies wurde sowohl bei Zellen mit EGFR-Promotor-Überexpression als auch bei Zellen mit nur endogenem EGFR-Promotor durchgeführt. In beiden Fällen war in den EGFP-hMR-transfizierten Zellen ein deutliches Signal für den EGFR-Promotor zu erkennen, das bei den EGFP-transfizierten Zellen fehlte, was auf eine direkte Bindung zwischen MR und EGFR-Promotor schließen lässt, an der allerdings noch weitere Proteine mitbeteiligt sein könnten (s. Abb. 24).

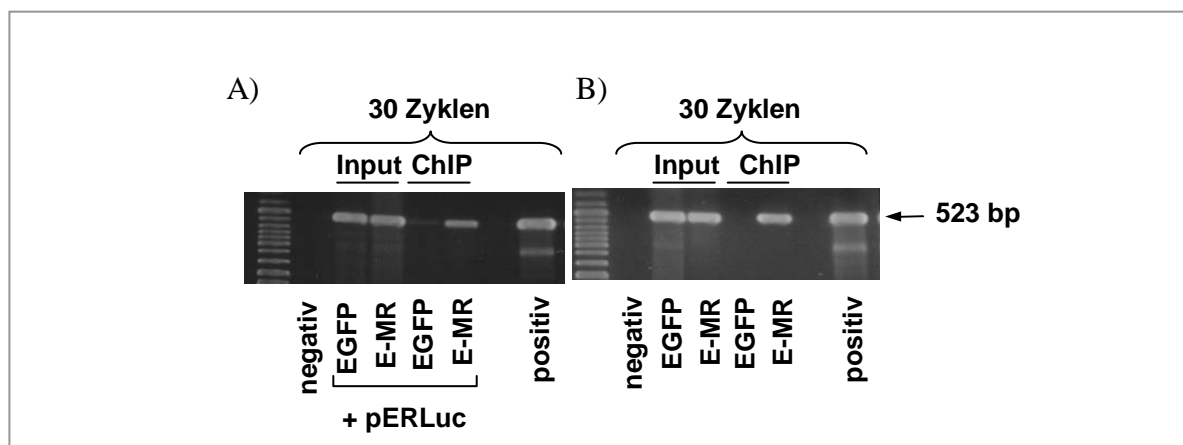


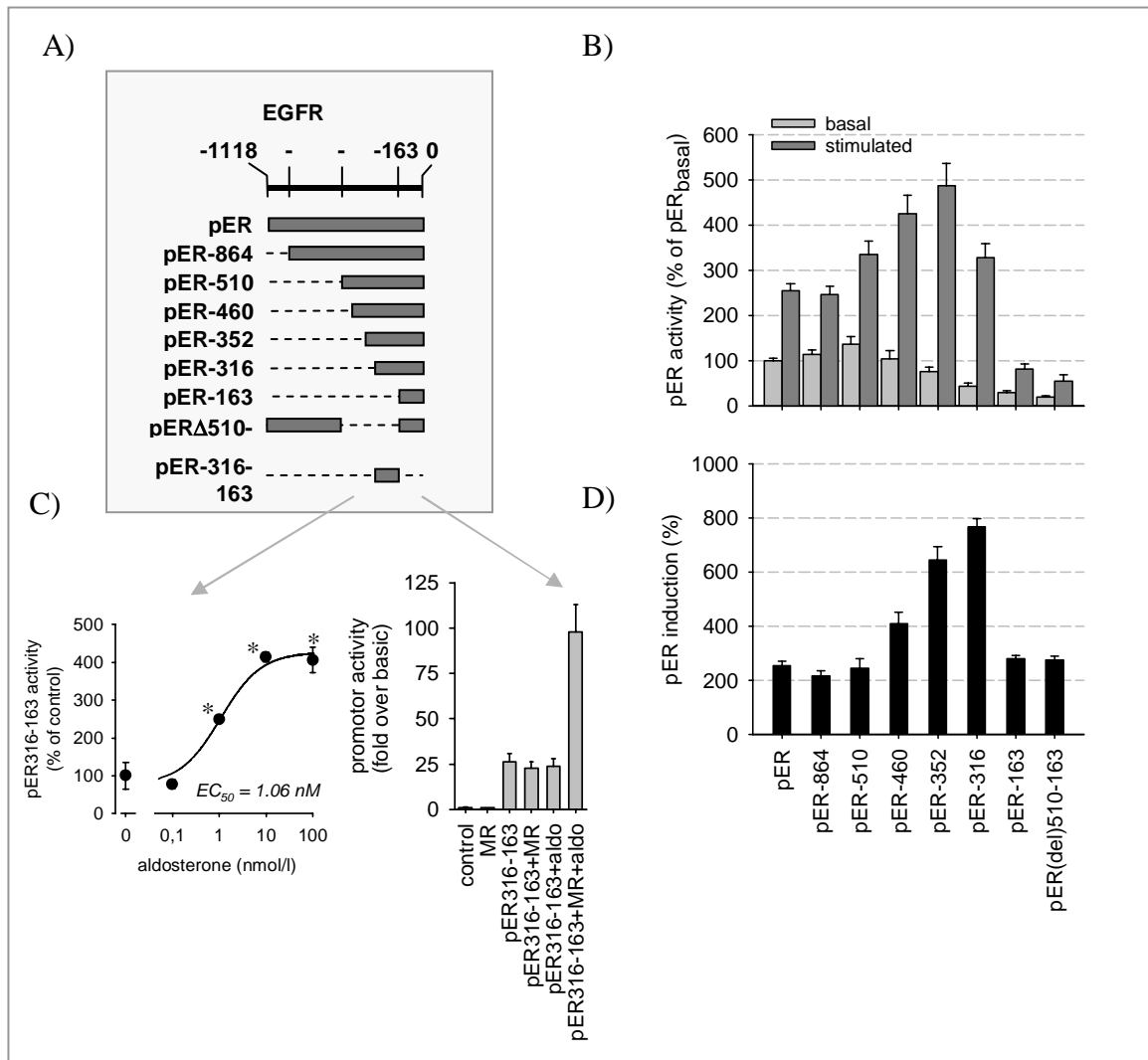
Abb. 24

Im ChIP zeigt sich eine direkte Bindung des hMR an den transfizierten A) oder endogenen B) EGFR-Promotor.

### 3.2.4. Beteiligte EGFR-Promotor-Region an Interaktion mit MR

Nach dem Hinweis auf eine Bindung zwischen hMR und EGFR-Promotor charakterisierten wir die daran beteiligten Anteile des hMR und des EGFR-Promotors weiter. Hierfür konstruierten wir verschiedene Deletionskonstrukte des EGFR-Promotors und untersuchten ihre Aktivität im Reporter-Gen-Assay in hMR-transfizierten HEK-Zellen, die mit 100 nM Aldosteron über 24 h inkubiert wurden (s. Abb 25). Bei allen untersuchten Konstrukten konnte der EGFP-hMR im Vergleich zum Leervektor eine 2-3fache Induktion auslösen. Die stärkste Induktion trat bei dem pER-316-Fragment auf. Gleichzeitig zeigt sich in Reporter-Gen-Versuchen ohne EGFP-hMR und nur mit EGFP, dass die Promotorgrundaktivität bei kürzer werdenden Promotorfragment auf etwa ein Viertel des Ausgangswertes abfällt. Wir schlussfolgerten hieraus, dass es bereits durch das kleinste Promotorfragment pER-163 zu

einer MR-abhängigen Stimulation der Promotoraktivität kommt. Da die Induktion des pER-316 am höchsten war und wir daher in dieser Region eine weitere Interaktionsstelle mit dem MR vermuteten, stellten wir ein weiteres Plasmid mit dieser Region, aber ohne die stimulierenden 163 bp vor der Translationsinitiationsstelle her. Auch in dem -316-(-163)-EGFR-Promotoranteil war eine Stimulation über den EGFP-hMR darstellbar. Diese zeigt eine klare Dosisabhängigkeit mit einem EC-Wert im nanomolaren Bereich, wie er für Aldosteron zu erwarten ist.



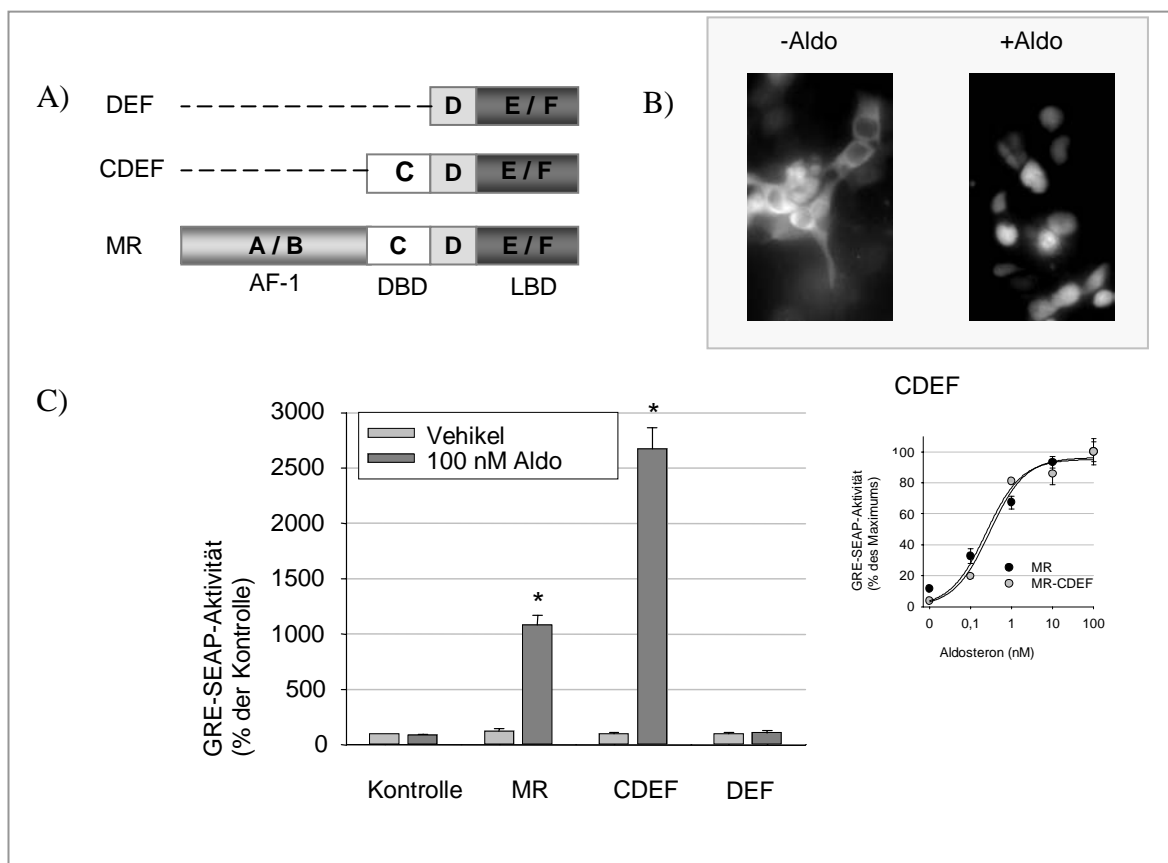
**Abb. 25**

Effekt von Aldosteron-gebundenem MR auf die Reporteraktivität von Deletionskonstrukten des EGFR-Promotors ( $n \geq 5$ ).

- Übersicht über die verschiedenen Luciferase-gekoppelten EGFR-Promotorfragmente, die hergestellt wurden.
- Reporter-Gen-Assay mit unterschiedlich langen EGFR-Promotor-Stücken in Anwesenheit von EGFP-hMR oder Leervektor EGFP.
- Dosisabhängig Stimulation des -316-(-163)-Promotorfragmentes (SEAP-Reporter) durch Aldosteron in Anwesenheit des EGFP-hMRs mit halbmaximalem Effekt bei etwa 1 nM.
- Induktion der EGFR-Promotoraktivität in Anwesenheit des EGFP-hMRs (Vergleich mit EGFP).

### 3.2.5. Beteiligte MR-Domänen an Interaktion mit EGFR-Promotor

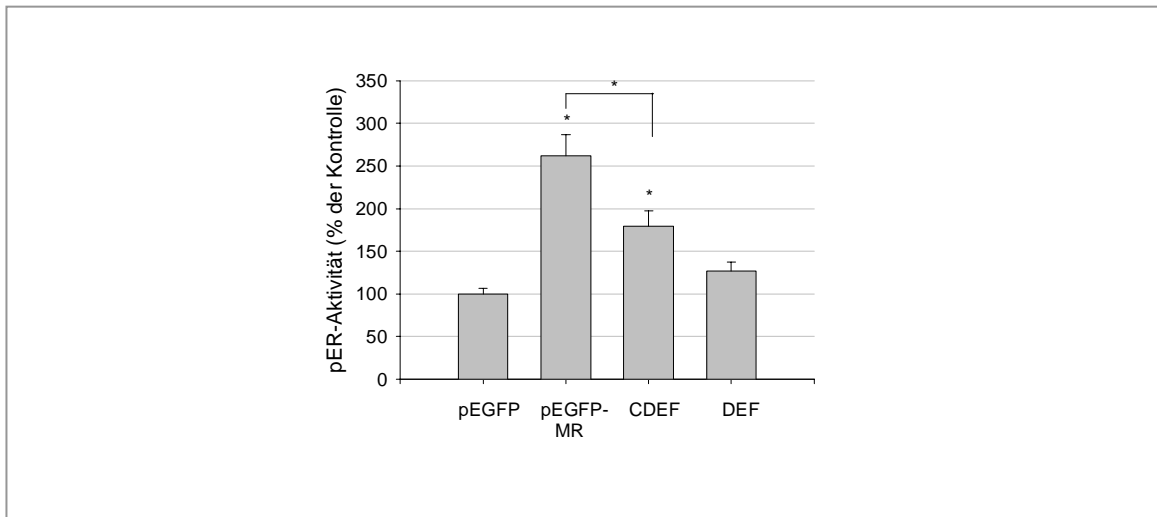
Auch für den hMR wurden Deletionskonstrukte hergestellt. Dem CDEF-Konstrukt fehlt die AB-Domäne, während beim DEF-Konstrukt neben der AB-Domäne zusätzlich die DNA-bindende Domäne entfernt wurde. CDEF und DEF wurden auf Translokationsfähigkeit und Transaktivierungsaktivität getestet. Wie auch beim hMR befand sich ohne Aldosteron der CDEF im Zytosol der Zelle und spart den Zellkern weitgehend aus. Nach 24 h Inkubation mit Aldosteron translozierte der Großteil der CDEF-Proteine in den Kern. Das Fluoreszenzmuster des CDEF gleicht somit dem vom kompletten hMR. Im GRE-SEAP-Reporter-Gen-Assay zeigte der CDEF eine etwa 2,5-fach höhere GRE-Aktivität als der hMR selbst. Das DEF-Konstrukt hatte erwartungsgemäß die Fähigkeit zu transaktivieren verloren, da ihm die DNA-Bindungsdomäne fehlt.



**Abb. 26**

- Schematische Darstellung der MR-Deletionskonstrukte.
- Translokation von CDEF aus dem Zytosol in den Zellkern bei 24 h Inkubation mit Aldosteron.
- Die Transaktivierungsaktivität im GRE-SEAP-Reporter-Assay ist beim CDEF-Konstrukt größer als beim MR, während das DEF-Konstrukt keine Transaktivierungsaktivität mehr besitzt ( $n = 8$ ,  $* p < 0,05$ ). Eingefügt: GRE-SEAP-Stimulation bei steigenden Aldosteronkonzentrationen.

Im pERLuc-Reporter-Gen-Assay zeigte sich, dass der CDEF zu einer signifikanten, aber deutlich geringeren Stimulation des EGFR-Promotors als der komplette EGFP-hMR führt. Der DEF dagegen, konnte keine vom Leervektor verschiedene Promotoraktivität induzieren. Wir schlussfolgerten daraus, dass die A/B-Domäne des MR für die Induktion des EGFR-Promotors essentiell ist, während die DNA-Bindungsdomäne nur z.T. daran beteiligt ist.



**Abb. 27**

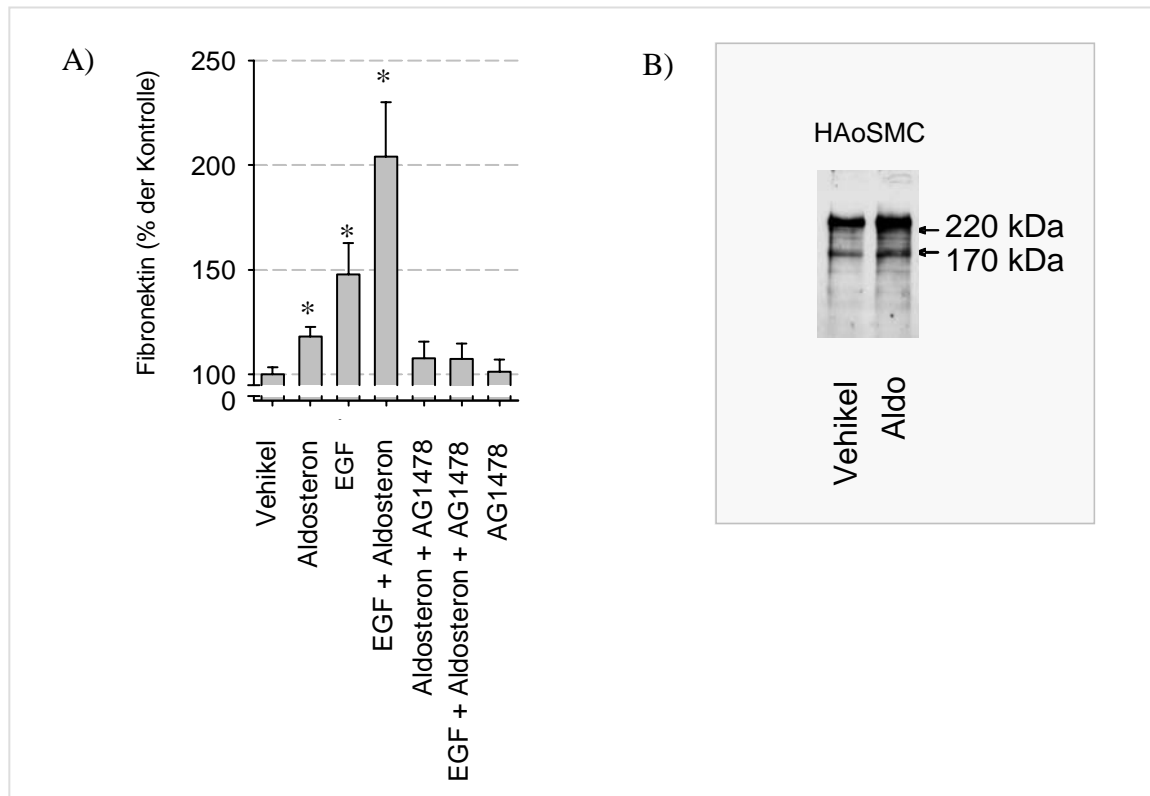
EGFP-CDEF transfizierte HEK-Zellen weisen eine etwas niedrigere EGFR-Promotoraktivität auf als EGFP-hMR transfizierte, während durch EGFP-DEF keine vom Leervektor verschiedene Aktivität erreicht wird ( $n \geq 5$ , \*  $p < 0,05$ ).

*Mit Hilfe von Chromatinimmunopräzipitation und Reporter-Gen-Assays mit trunkierten Luciferase-gekoppelten EGFR-Promotorfragmenten und EGFP-gekoppelten MR-Konstrukten konnten wir also zeigen, dass der MR zu einer vermehrten EGFR-Promotoraktivität führt, wofür die Region -316-(-163) und -163-(-1) des EGFR-Promotors und die A/B-Domäne des MR von Bedeutung ist.*

### **3.3. Hinweise für eine pathophysiologische Bedeutung**

Um die in der Literatur postulierte pathophysiologische Relevanz einer erhöhten EGFR-Expression für die vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix und damit für Remodelingprozesse zu bestätigen, wurde die Fibronektinsekretion von HAoSMC-Primärkulturen bestimmt. Wir wählten diese Zellen, da in humanen aortalen Endothelzellen in Primärkultur kein deutlicher Anstieg der EGFR-Expression detektierbar war, während er in den glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen und durch den MR-Antagonisten Spironolaktin komplett gehemmt werden konnte (s. Abb.18). Außerdem war in den in vivo Versuchen der Anstieg der EGFR-Expression in der Aorta am deutlichsten ausgefallen. Aldosteron-stimulierte HAoSMC zeigten eine leicht erhöhte Fibronektinsekretion und ließen sich durch

den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 auf Kontrollniveau hemmen. Wesentlich eindrucksvoller war die Wirkung von Aldosteron in Anwesenheit von EGF, denn Aldosteron konnte die Wirkung des EGF wesentlich verstärken. Wieder war der Effekt durch AG1478 hemmbar.



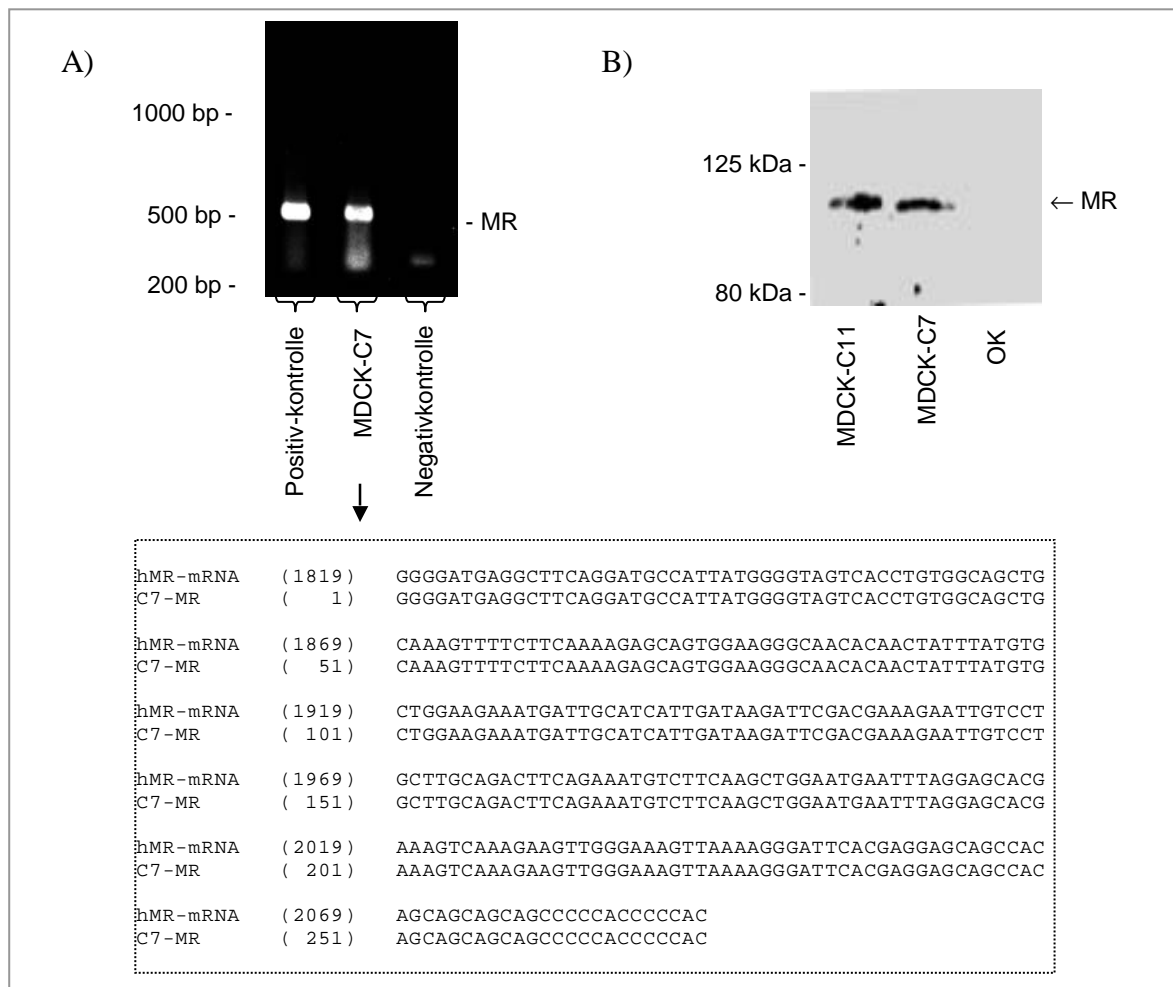
**Abb. 28**

- A) Aldosteron induziert in HAoSMC die Fibronectinsekretion besonders in Anwesenheit von EGF. Die Fibronectinsekretion ist durch den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 hemmbar (n = 8-20, \* p < 0,05).
- B) Western Blot zu A).

*Unsere Ergebnisse zur Fibronectinsekretion unterstützen die Hypothese, dass die Aldosteron-induzierten EGFR-Expression an vaskulären Remodelingprozessen beteiligt ist und zu einer vermehrten Bildung von extrazellulärer Matrix führen kann, besonders in Anwesenheit von weiteren Substanzen wie EGF.*

### 3.4. Einfluß der vermehrten EGFR-Expression auf die Aldosteron-induzierte Natriumresorption in der Niere – Hinweise für eine negative Rückkopplungsschleife

Aldosteron führt klassischerweise im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere nach Bindung an den MR zu einer vermehrten Na<sup>+</sup>-Resorption, die hauptsächlich über ENaC (epithelialer Na<sup>+</sup>-channel) vermittelt wird. EGF dagegen übt einen hemmenden Einfluß auf die Natriumresorption aus, so dass es durch die Aldosteron-induzierte EGFR-Hochregulierung zu einer negativen Rückkopplungsschleife kommen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, suchten wir ein Zellkulturmodell mit MR-Expression und konstanter, gut nachweisbarer Natriumresorption. Beide Voraussetzungen werden von MDCK-C7-Zellen erfüllt. Auf mRNA-Ebene ließ sich der MR durch RT-PCR mit Intron-überbrückenden Primern nachweisen, wodurch ein falsch positives Signal durch genomische DNA ausgeschlossen werden kann.

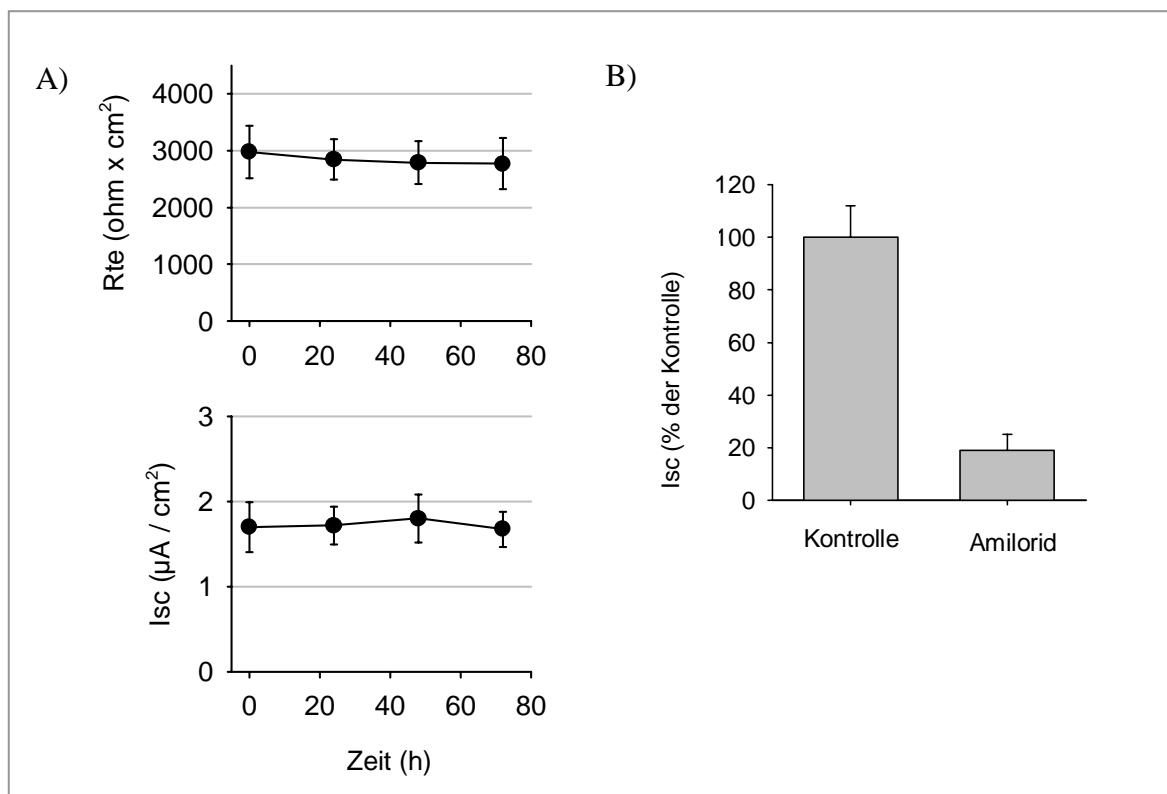


**Abb. 29**

Nachweis des hMR in MDCK-C7-Zellen auf mRNA-Ebene durch RT-PCR mit Sequenzierung des erhaltenen Fragmentes A) und auf Proteinebene B).

Um eine unspezifische Reaktion der Primer auszuschließen, wurde das RT-PCR-Stück aus dem Agarosegel extrahiert und sequenziert, wobei sich eine 100%ige Übereinstimmung mit der MR-Sequenz ergab. Auch auf Proteinebene war der MR im Western Blot in C7-Zellen nachweisbar (s. Abb. 29).

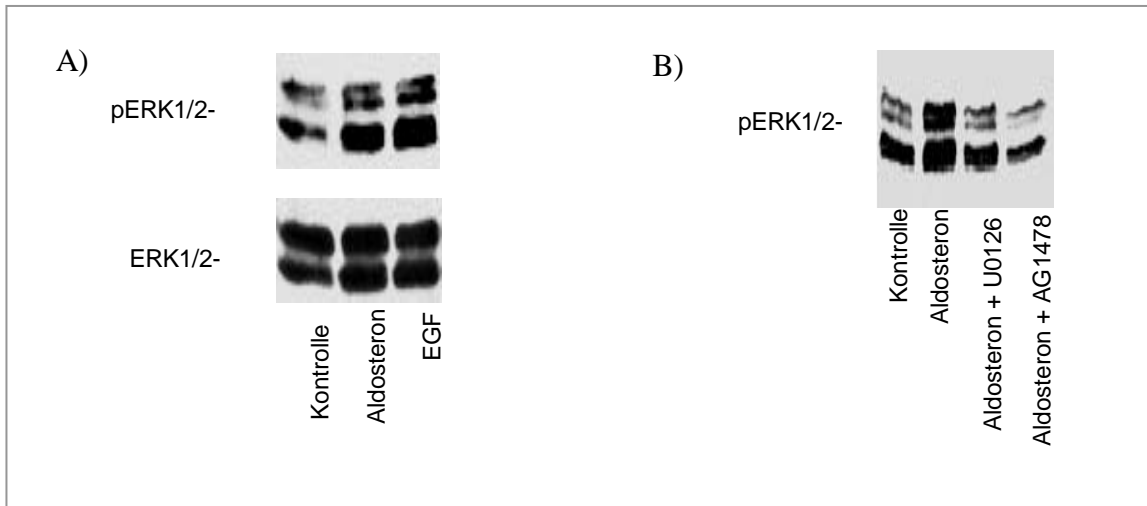
Bei den C7-Zellen ließen sich ein konstanter transepithelialer Widerstand und ein konstanter Kurzschlussstrom über 72 h nachweisen (s. Abb. 30). Dieser schien größtenteils durch ENaC-vermittelte Natriumresorption zustande zu kommen, da er durch Amilorid fast vollständig gehemmt werden konnte. Somit ließen die Kurzschlussstrommessungen in den C7-Zellen Rückschlüsse auf das Ausmaß der ENaC-vermittelten Natriumresorption zu.



**Abb. 30**

- A) Transepithelialer Widerstand ( $R_{te}$ ) und Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) sind bei MDCK-C7-Zellen über 72 h konstant ( $n = 15$ ).
- B) Der Kurzschlussstrom in MDCK-C7-Zellen kann durch 10  $\mu\text{M}$  Amilorid (ENaC-Inhibitor) fast vollständig gehemmt werden ( $n = 6$ ).

Als nächstes wurde die ERK-Phosphorylierung im C7-Klon untersucht. Wie Abb. 31 zeigt, kam es in C7-Zellen zu einer endogenen ERK-Phosphorylierung, die durch 48 h Inkubation mit Aldosteron oder EGF verstärkt wurde, ohne vermehrte Expression von ERK an sich. Durch den MEK-Inhibitor U0126 oder den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren AG1478 konnte die ERK-Phosphorylierung gehemmt werden.



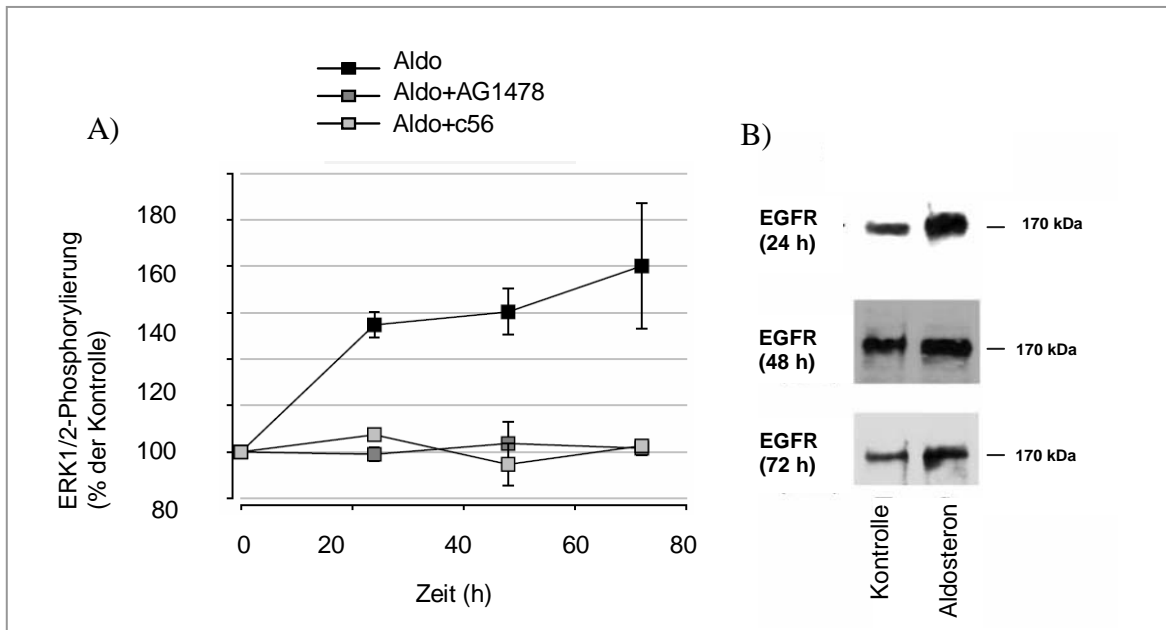
**Abb. 31**

- A) Stimulierung der ERK-Phosphorylierung in C7-Zellen nach 48 h Inkubation mit 10 nM Aldosteron oder 10 µg/l EGF.  
 B) Hemmung der Aldosteron-induzierten ERK-Phosphorylierung durch 10 µM UO126 oder 100 nM AG1478.

Im Zeitverlauf im Direkt-ELISA war eine erhöhte ERK-Phosphorylierung bereits nach 24 h maximal ausgeprägt und hielt über 72 h Aldosteroninkubation an (s. Abb. 32). Durch EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (AG1478, c56) ließ sich dieser Anstieg zu jedem Zeitpunkt komplett unterdrücken.

Diese Befunde korreliert gut mit den Western-Blot-Daten zur EGFR-Expression, die auch nach 24 h, 48 h und 72 h einen Anstieg der EGFR-Expression bei Inkubation mit Aldosteron zeigten, wobei nach 24 h bereits die Maximalwerte erreicht wurden. Dies lässt auf eine Aldosteron-induzierte Expression des EGFR mit vermehrter stromabwärts gelegener Signaltransduktion schließen.

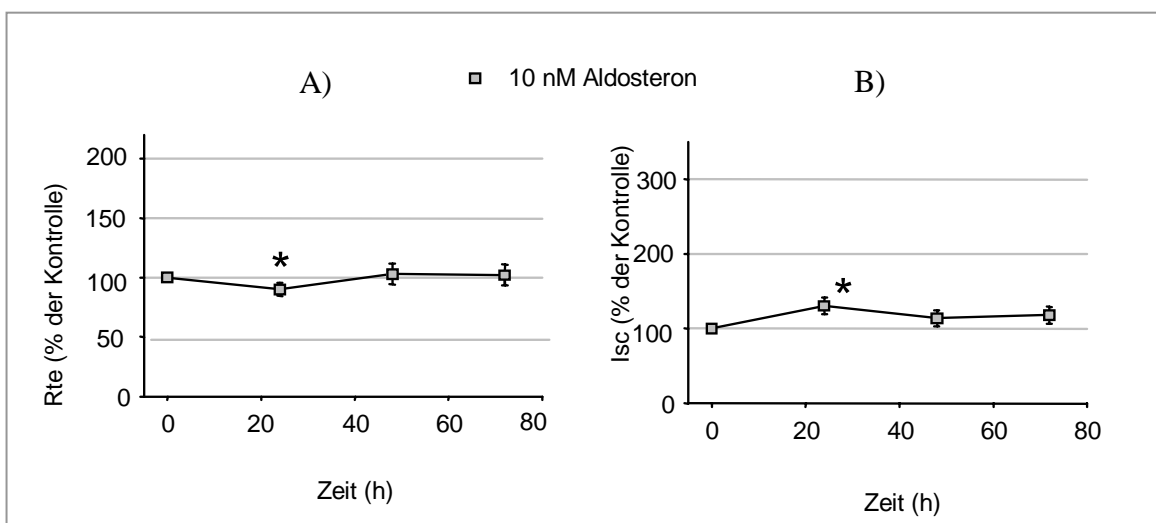




**Abb. 32**

- A) Aldosteron-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist durch die EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren AG1478 (100 nM) und c56 (100 nM) inhibierbar (n = 6).  
 B) Aldosteron (10 nM) stimuliert die EGFR-Expression in C7-Zellen.

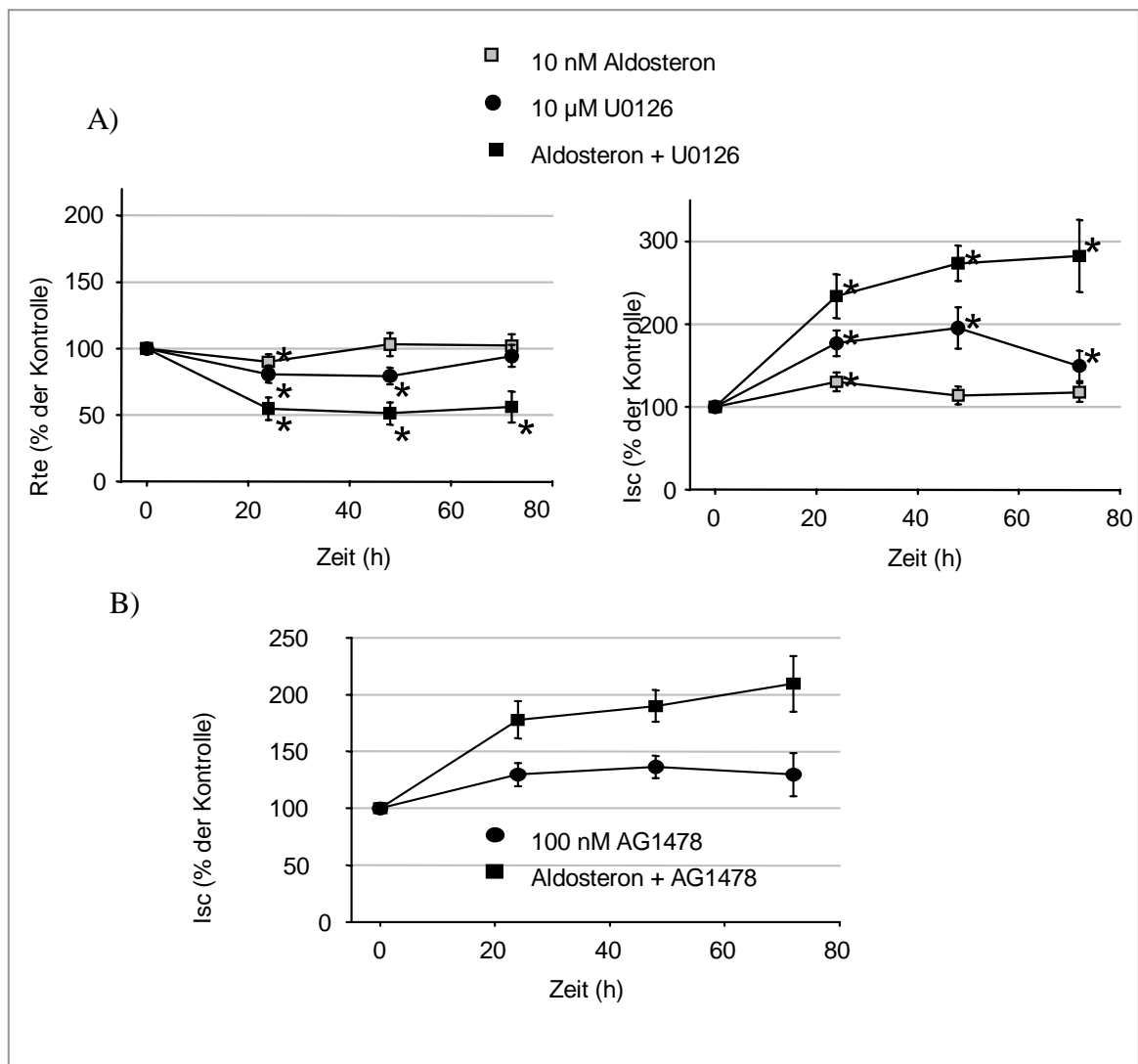
Um die Praxistauglichkeit unseres MDCK-C7-Modells zu testen, führten wir transepitheliale Widerstands- und Potentialdifferenzmessungen an C7-Zellmonolayern in An- und Abwesenheit von 10 nM Aldosteron durch. Nach Aldosteroninkubation kam es zu einem geringen Anstieg des Kurzschlussstroms und einem leichten Abfall des transepithelialen Widerstandes nach 24 h, wobei sich die Werte im Anschluß daran wieder normalisierten (s. Abb. 33).



**Abb. 33**

10 nM Aldosteron führen zu einer leichten temporären Abnahme des transepithelialen Widerstand ( $R_{te}$ ) A) und zu einer leichten temporären Zunahme des Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) B) in C7-Zellen (n = 9, \* p < 0,05).

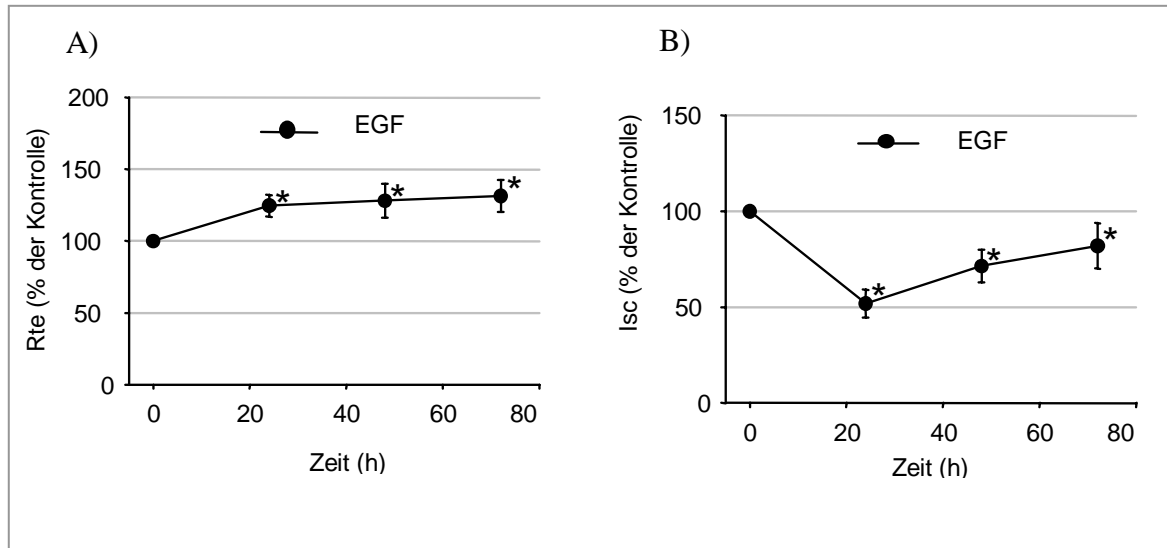
Eine mögliche Erklärung für die Kürze der Aldosteron-induzierten Veränderung könnte ein negativer Rückkopplungsmechanismus sein. Um den Effekt des EGFR-Signaltransduktionsweges auf die Natriumresorption durch Aldosteron zu untersuchen, hemmten wir daher die ERK1/2-Phosphorylierung durch UO126 bei gleichzeitiger Aldosteronstimulation. Hierbei zeigten sich eine signifikante Zunahme des Kurzschlussstroms und eine signifikante Abnahme des transepithelialen Widerstandes auch unter Berücksichtigung des Eigeneffektes von UO126. Ein vergleichbarer Effekt ließ sich durch AG1478 erzielen (s. Abb. 34).



**Abb. 34**

- A) Aldosteron-vermittelte Effekte auf den transepithelialen Widerstand ( $R_{te}$ ) und den Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) in C7-Zellen sind durch 10  $\mu$ M UO126 verstärkbar ( $n = 9$ , \*  $p < 0,05$ ).
- B) Aldosteron-vermittelte Zunahme des Kurzschlussstroms in C7-Zellen ist durch AG1478 (100 nM) verstärkbar ( $n = 9$ , \*  $p < 0,05$ ).

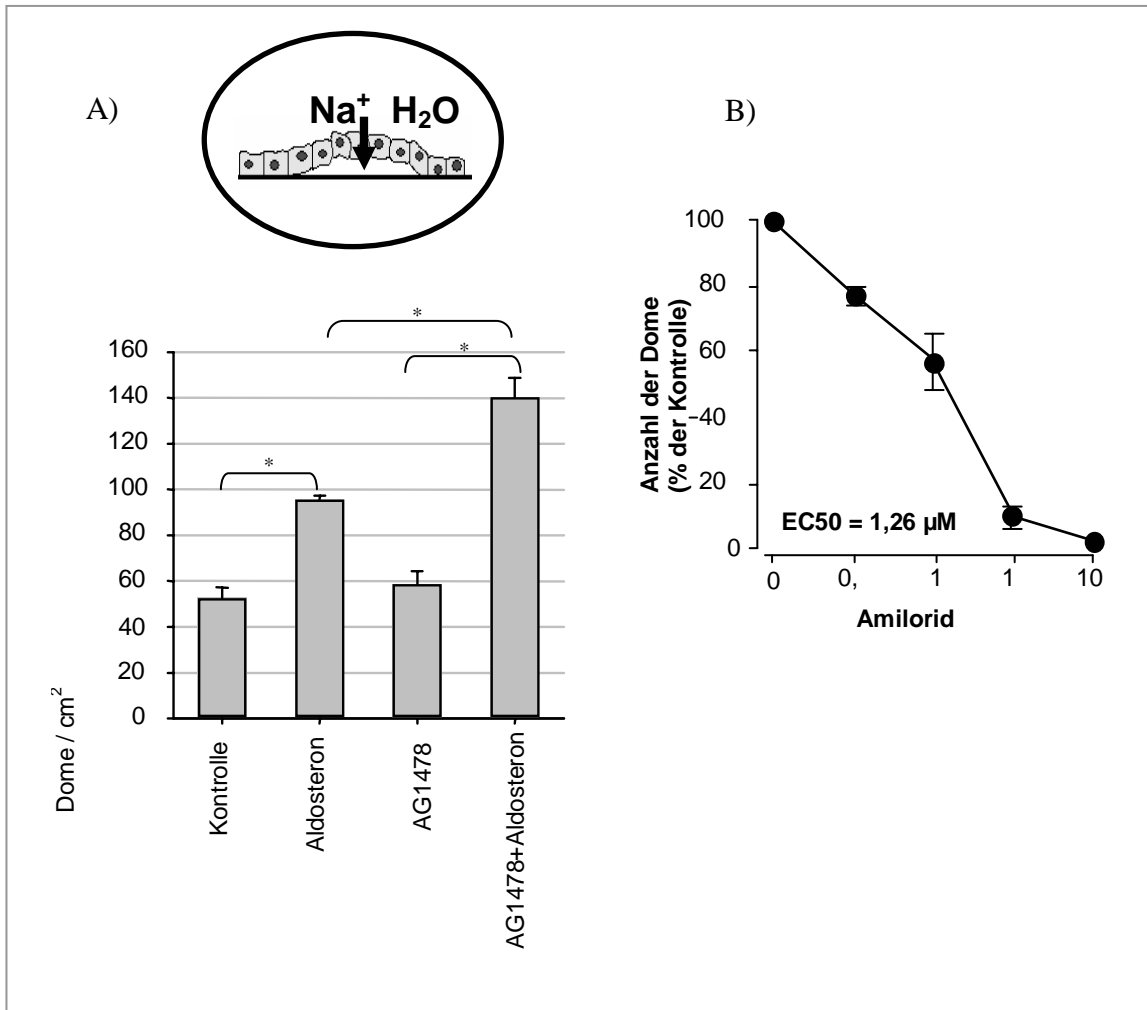
Um den Einfluß der autokrinen Aktivierung des EGFR durch EGF zu überprüfen, wurden die Zellen mit EGF inkubiert. Hierbei kam es zu einem signifikanten Anstieg des transepithelialen Widerstandes und zu einem Abfall des Kurzschlussstromes (s. Abb. 35).



**Abb. 35**

EGF führen zu einer leichten Zunahme des transepithelialen Widerstand (R<sub>te</sub>) A) und zu einer Abnahme des Kurzschlussstrom (I<sub>sc</sub>) B) in C7-Zellen (n = 12, \* p < 0,05).

Eine weitere Möglichkeit, das Ausmaß der Natriumresorption bei C7-Zellen zu untersuchen, ist die Quantifizierung der Dombildung. Dome entstehen bei Zellmonolayern durch Resorption von Natrium und Wasser von der apikalen zur basolateralen Membranseite. Hierdurch löst sich ein Teil der Zellen von ihrer Unterlage ab, während andere Zellen noch haften bleiben. Da die seitlichen Zellkontakte zwischen den Zellen erhalten bleiben, bilden sich kuppelförmig abgehobene Zellareale, sogenannte Dome. Dieses Phänomen kann durch Amilorid mit einer EC<sub>50</sub> von etwa 1,26 µmol/l gehemmt werden, so dass es hauptsächlich durch ENaC-vermittelte Natriumresorption zustande zu kommen scheint (s. Abb. 36). Aldosteron führt zu einer verstärkten Dombildung, die bei Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase durch AG1478 noch zusätzlich gesteigert wird.



**Abb. 36**

Anzahl der entstandenen Dome pro Fläche nach 24 h Inkubation mit entweder 10 nM Aldosteron oder 100 nM AG1478 oder einer Kombination aus beiden (n = 4, \* p < 0,05) A). Hemmung der Dombildung durch Amilorid mit einem EC50 von 1,26 µM B) (n = 4).

*Zusammenfassend bestätigte sich, dass Aldosteron über Stimulation des ENaC zu einer vermehrten Na<sup>+</sup>-Resorption in den Hauptzellen des Sammelrohres führt. Zusätzlich zeigte sich, dass es durch Aldosteron auch zu einer vermehrten EGFR-Expression und ERK-Phosphorylierung kommt, so dass eine negative Feedbackschleife entsteht, die die Aldosteron-induzierte Na<sup>+</sup>-Resorption limitiert.*

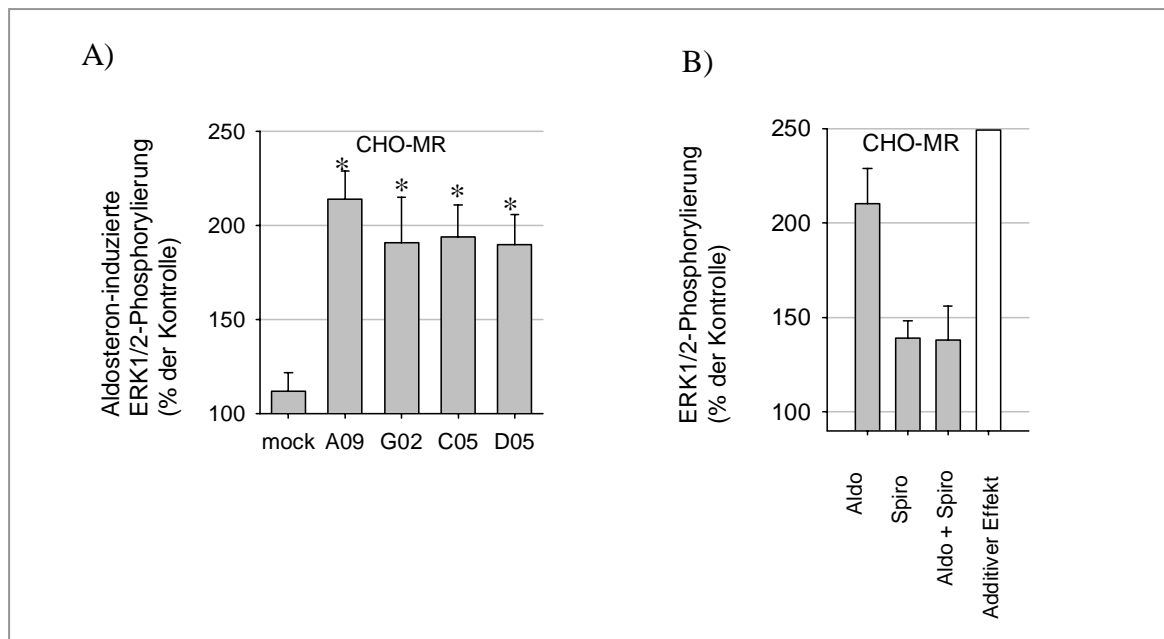
### 3.5. Nicht-genotrope Effekte von Aldosteron

Bisher konnten wir zeigen, dass Aldosteron nach mehrtägiger Inkubation *in vivo* und *in vitro* zu einer Hochregulierung der EGFR-Expression mit vermehrter EGFR-Tyrosinkinase-Aktivität und ERK-Phosphorylierung führt. Als nächstes untersuchten wir, ob es durch Aldosteron auch zu schnellen, nicht-genotropen Effekten auf die EGFR-Signalkaskade kommen kann.

#### 3.5.1. ERK-Phosphorylierung

##### 3.5.1.1. CHO-Zellen

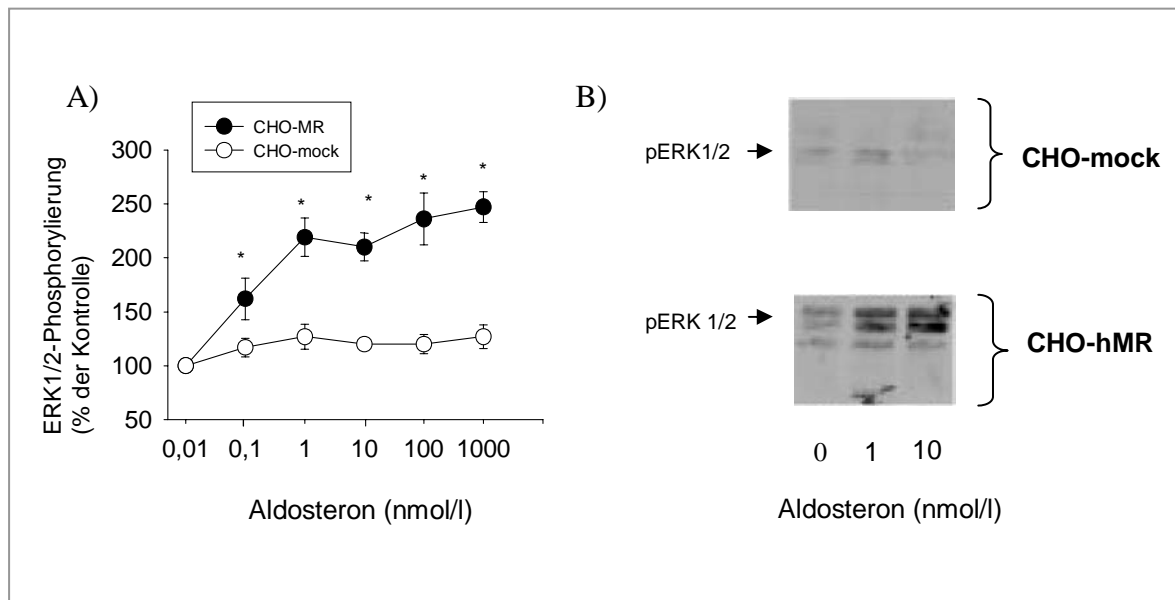
Bereits nach 5-minütiger Inkubation mit Aldosteron war eine vermehrte ERK1/2-Phosphorylierung in stabil transfizierten CHO-hMR-Klonen nachweisbar, die aufgrund der Kürze der Zeit nicht durch primär genomische Effekte entstanden sein konnte (s. Abb. 37). Dagegen zeigten scheintransfizierte CHO-Zellen keinen signifikanten Anstieg der ERK-Phosphorylierung. Die Aldosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung ließ sich durch den MR-Antagonisten Spironolakton (1  $\mu$ M) teilweise inhibieren, was auf eine Beteiligung des MR hinweist. Spironolakton selbst führte auch zu einer moderaten ERK-Aktivierung.



**Abb. 37** (n  $\geq$  9, \* p < 0,05)

- Aldosteron führt zu einer gesteigerten schnellen (5 min) ERK1/2-Phosphorylierung in stabil transfizierten CHO-MR-Klonen.
- Durch 10 nM Aldosteron induzierte ERK1/2-Phosphorylierung ist durch 1  $\mu$ M Spironolakton teilweise hemmbar. Der additive Effekt ist der Effekt, den man bei Zugabe von Aldosteron und Spironolakton erwarten würde, wenn keine Interaktion zwischen beiden bestünde.

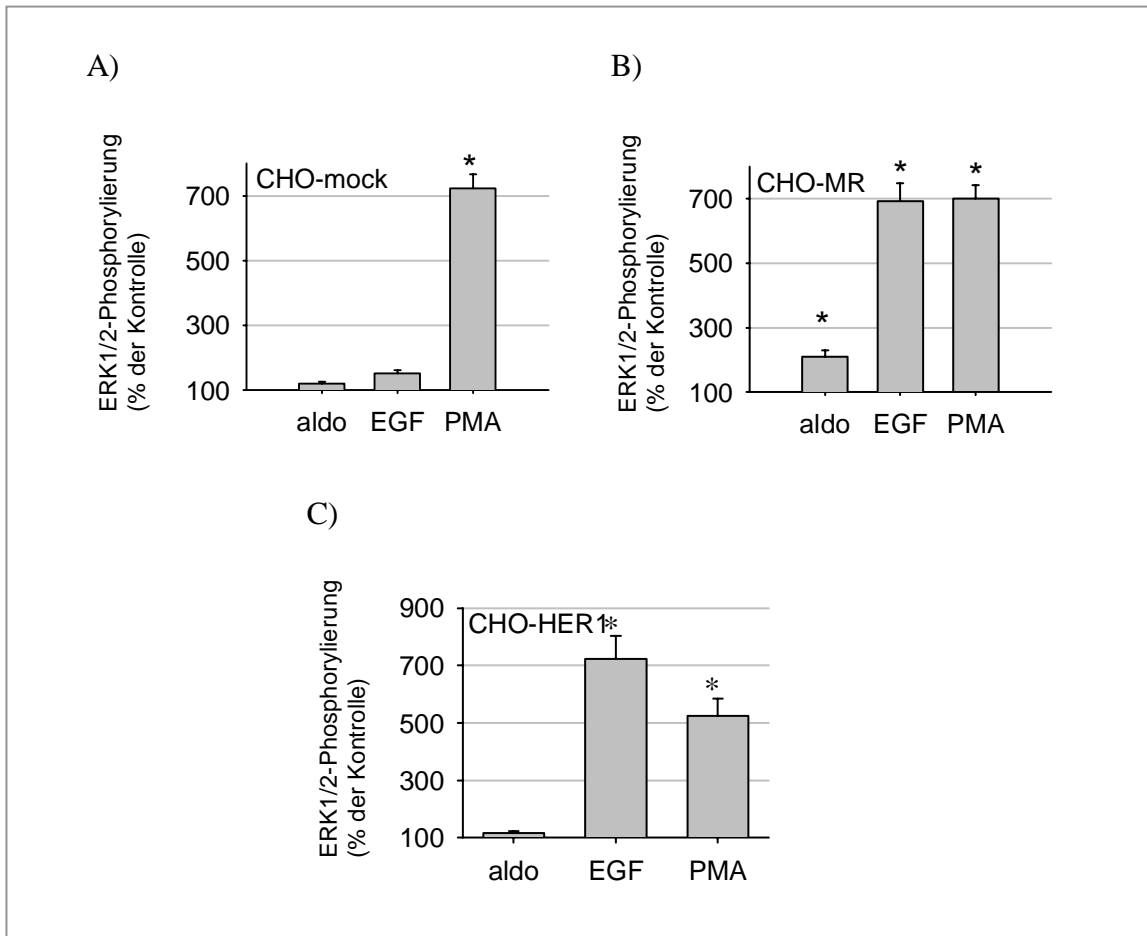
In der Dosis-Wirkungskurve zeigte sich im Direkt-ELISA bei Zellen mit MR ein dosisabhängiger Anstieg der ERK-Phosphorylierung, der bereits bei 0,1 nM signifikant war, also im Bereich physiologischer Aldosteronkonzentrationen (s. Abb. 38). Dieser Trend ließ sich auch im Western Blot bestätigen (s. auch Abb. 12).



**Abb. 38**

- A) Nur in CHO-MR-Zellen führen 5 min Inkubation mit Aldosteron (10 nM) zu einer vermehrten ERK1/2-Phosphorylierung im ELISA ( $n \geq 12$ , \*  $p < 0,05$ ).
- B) Auch im Western Blot kommt es nur bei Vorhandensein des MR zu einer gesteigerten ERK-Aktivierung bei 5-minütiger Inkubation mit Aldosteron.

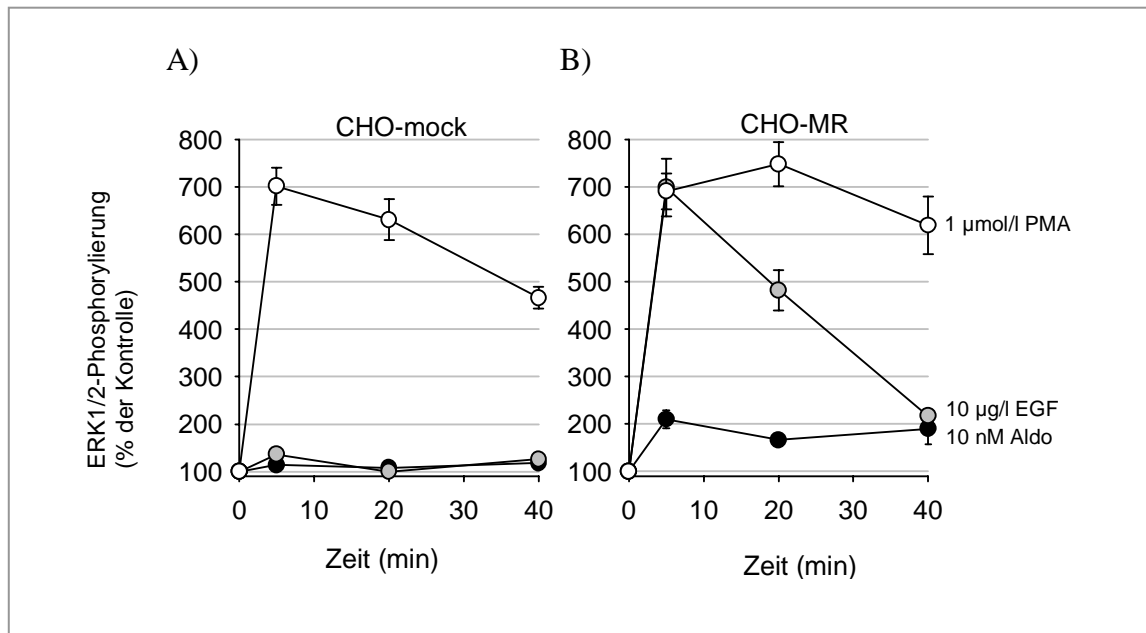
Um die Rolle des MR an dieser schnellen Aldosteronwirkung zu eruieren, wurde die Höhe der ERK-Phosphorylierung bei steigenden Aldosteronkonzentrationen in scheintransfizierten CHO-Zellen ohne MR untersucht (s. Abb. 38). Diese scheintransfizierten Zellen zeigten keine signifikante Steigerung der ERK-Aktivierung nach Inkubation mit EGF oder Aldosteron. Sie waren aber genauso gut durch die Positivkontrolle PMA zu stimulieren wie die CHO-MR-Klone (s. Abb. 39). Auch stabil HER1-überexprimierende CHO-Zellen reagierten auf Aldosteron nicht mit einem Anstieg der ERK-Phosphorylierung, aber auf EGF und PMA.



**Abb. 39** (n ≥ 12, \* p < 0,05)

ERK1/2-Phosphorylierung in CHO-mock-Zellen A), CHO-MR-Klonen B) und CHO-HER1-Zellen C) nach 5 min Inkubation mit Aldosteron (10 nM), EGF (10 µg/l) oder PMA (1 µM).

Im Zeitverlauf (Abb. 40) zeigte sich bei CHO-mock-Zellen ohne MR nur bei Stimulation mit 1 µmol/l PMA eine signifikante Zunahme der ERK-Phosphorylierung, die nach etwa 10 min ihr Maximum erreichte und dann über die nächsten 40 min kontinuierlich auf ca. 480 % zurückging. Bei den CHO-hMR-Zellen kam es als Antwort auf PMA oder EGF ebenfalls zu einer maximalen ERK1/2-Phosphorylierung nach etwa 10 min, die danach unterschiedlich schnell abfiel, und zwar bei EGF- wesentlich schneller als bei PMA-Inkubation. Der Anstieg durch Aldosteron war wesentlich geringer, hielt aber 40 min an.

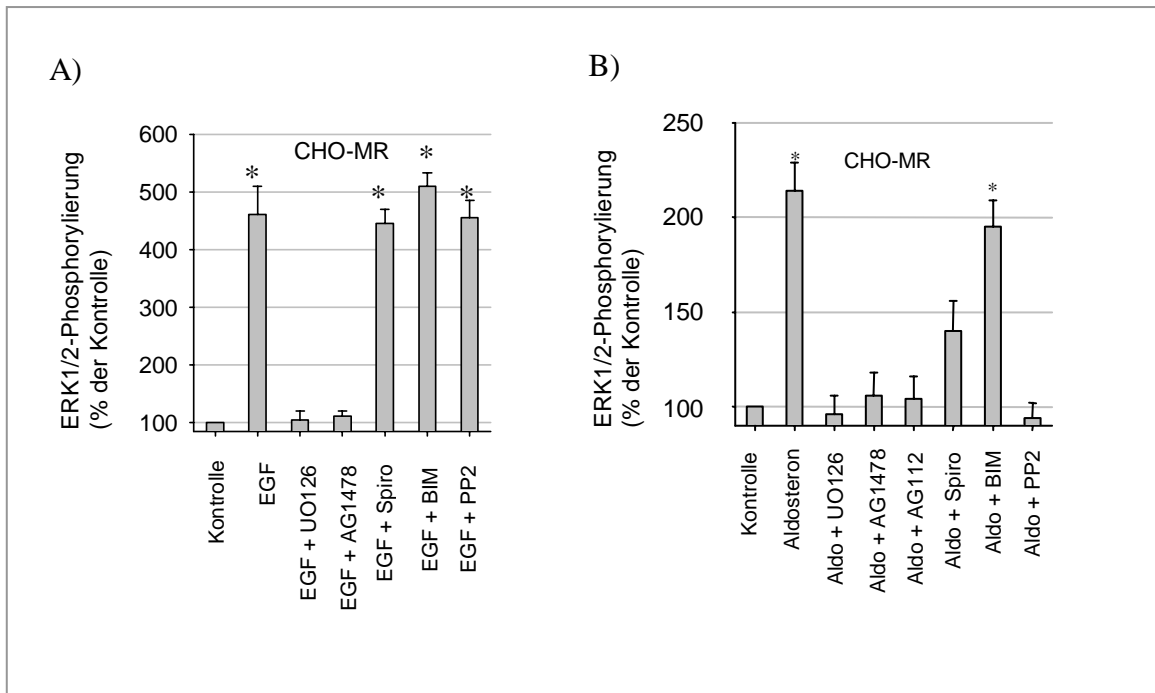


**Abb. 40** (n ≥ 9)

Zeitverlauf der schnellen ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation mit 1 μM PMA, 10 μg/l EGF oder 10 nM Aldosteron in CHO-mock-Zellen A) oder CHO-MR-Klonen B).

Um den Mechanismus der ERK1/2-Aktivierung näher zu charakterisieren, führten wir als Nächstes Hemmversuche mit verschiedenen Inhibitoren bei Stimulation mit EGF oder Aldosteron durch. Sowohl für PKC als auch für c-Src gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Beteiligung an schnellen Aldosteroneffekten. Wie erwartet, ließ sich bei CHO-MR-Zellen durch EGF eine starke ERK-Phosphorylierung induzieren. Diese war durch Inhibition von MEK durch UO126 oder durch den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 auf Kontrollniveau reduzierbar. Keinen Einfluss auf die Höhe der EGF-induzierten ERK-Phosphorylierung hatte die Gabe von Spironolaktone, BIM (PKC-Inhibitor) oder PP2 (c-Src-Inhibitor). Bei Stimulation mit Aldosteron war die hervorgerufene ERK-Aktivierung geringer und ebenfalls durch UO126 und zwei verschiedene Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase, AG1478 und AG112, hemmbar. Auch die bereits gezeigte inkomplette Hemmung durch Spironolaktone ließ sich reproduzieren. Dies lässt auf eine Aktivierung der EGFR-Tyrosinkinase mit nachfolgender Stimulierung der MAP-Kinasen schließen. Interessanterweise führte auch der c-Src-Hemmer PP2 zu einer Hemmung der Aldosteron-induzierten ERK-Phosphorylierung. BIM dagegen, ein PKC-Hemmer, hatte keinen Effekt auf die ERK-Phosphorylierung (s. Abb. 41).



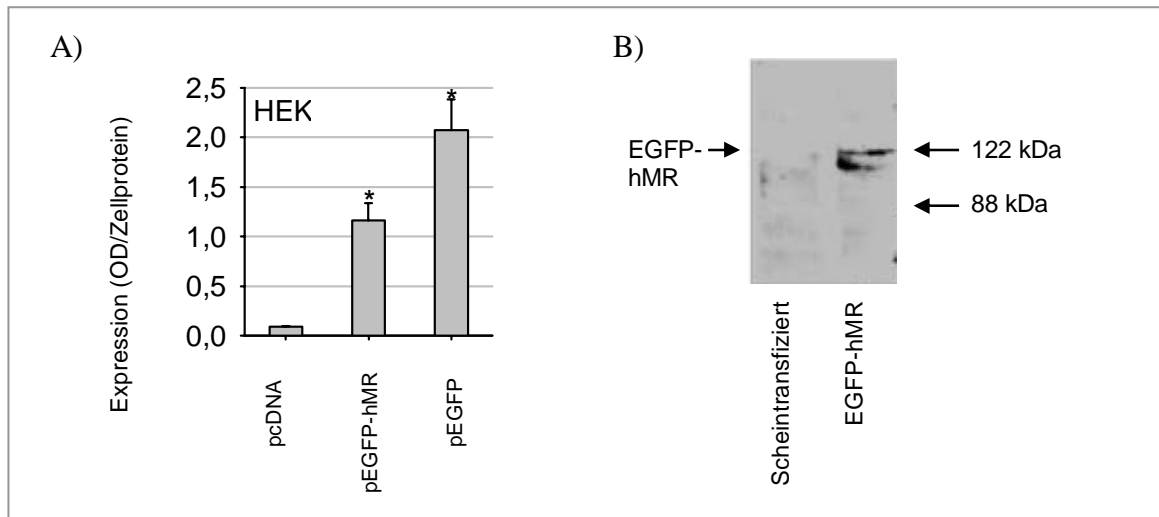


**Abb. 41** (n ≥ 9, \* p < 0,05, Inkubationszeit 5 min).

- A) Die schnelle EGF-induzierte ERK1/2-Aktivierung in CHO-MR-Zellen lässt sich durch Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase (100 nM AG1478) und von MEK (10 µM UO126) inhibieren, nicht aber durch MR-Antagonismus (1 µM Spironolaktone), PKC-Inhibition (100 nM BIM) oder c-Src-Hemmer (100 nM PP2).
- B) Die schnelle Aldosteron-induzierte ERK1/2-Aktivierung in CHO-MR-Zellen lässt sich durch Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase (100 nM AG1478, 1 µM AG112), von MEK (10 µM UO126) und durch den c-Src-Hemmer PP2 (100 nM) inhibieren, nicht aber durch PKC-Inhibition (100 nM BIM).

### 3.5.1.2. HEK-Zellen

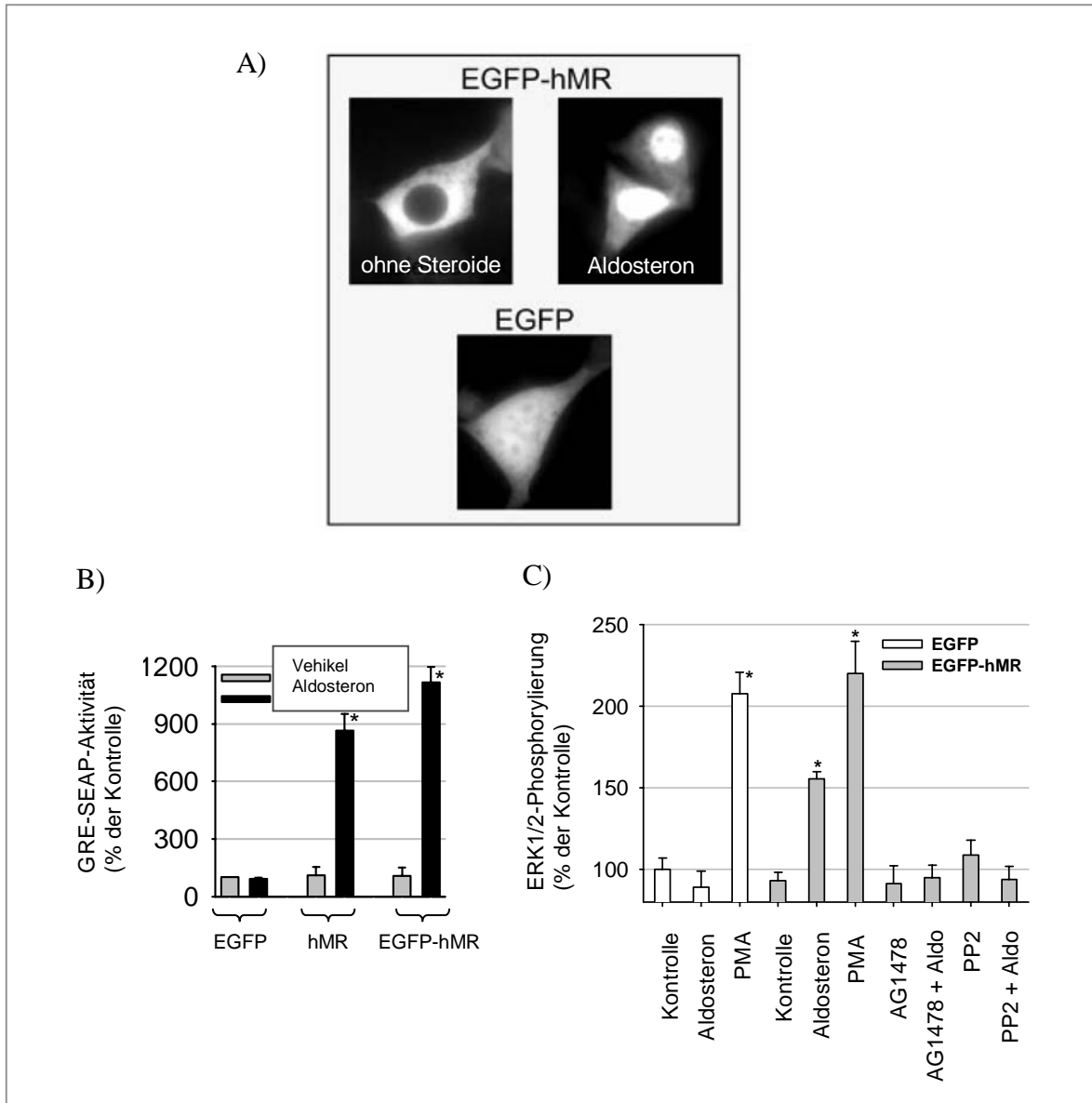
Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Zelllinien zu überprüfen, führten wir zusätzlich Experimente an HEK-Zellen durch. Bei diesen ist der EGFR aber nicht der MR endogen nachweisbar. Zur Charakterisierung des neuen Zellsystems testeten wir als erstes die Expression des EGFP-hMR im Vergleich zu Leervektoren (pcDNA3 und pEGFP) im EGFP-Direkt-ELISA in transient transfizierten HEK-Zellen (s. Abb. 42). Hierbei war das Signal des EGFP etwa halb so stark wie das des EGFP-hMR. Auch im Western Blot konnte der EGFP-hMR nachgewiesen werden.



**Abb. 42**

Kontrolle der EGFP-hMR-Expression in transient transfizierten HEK-Zellen durch ELISA (n = 6, \* p < 0,05) A) und Western Blot B).

Da EGFP ein 30 kDa Protein ist, wollten wir sicherstellen, dass die Kerntranslokation des hMR bei Inkubation mit Aldosteron auch mit EGFP-Tag regelrecht erfolgen kann. Wie die Fluoreszenzmikroskopie zeigte, ist der EGFP-hMR bei Zellen ohne Aldosteron hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und transloziert bei Inkubation mit Aldosteron regelrecht in den Kern (s. Abb. 43). Bei EGFP-transfizierten Zellen dagegen blieb das Fluoreszenzsignal mit und ohne Aldosteron diffus über die Zelle verteilt. Als weitere funktionelle Untersuchung schlossen wir einen Reporter-Gene-Assay an, bei dem die Bindung des hMR an GRE (glucocorticoid response element) durch Bestimmung der SEAP-Aktivität quantifiziert wurde. Während bei Zellen, die transient mit EGFP transfiziert worden waren, Aldosteron keinen Anstieg der SEAP-Aktivität verursachte, stieg diese bei hMR- oder EGFP-hMR-transfizierten Zellen deutlich an. Wie bei den CHO-hMR-Zellen reagierten die hMR-transfizierten HEK-Zellen auf 5-minütige Aldosteroninkubation mit einer vermehrten ERK-Phosphorylierung, die durch AG1478 und PP2 hemmbar war. EGFP-transfizierte Zellen reagierten nicht auf Aldosteron, aber auf die Positivkontrolle PMA.

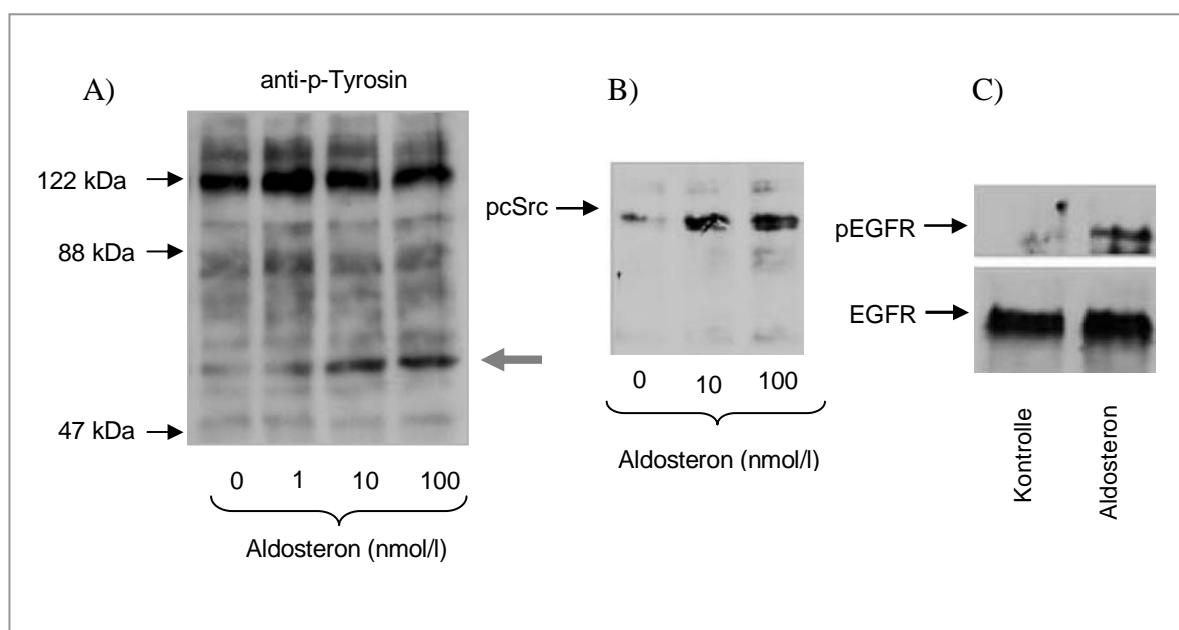


**Abb. 43**

Funktionelle Untersuchung des EGFP-hMR in transient transfizierten HEK-Zellen.

- In der Immunfluoreszenzmikroskopie sieht man, dass EGFP-hMR nach Stimulation mit Aldosteron regelrecht vom Zytoplasma in den Kern transloziert.
- Im GRE-SEAP-Reporter-Gen-Assay führt EGFP-hMR zu einer mit dem untaggten hMR vergleichbaren Transaktivierung nach 24 h Inkubation mit 100 nM Aldosteron. (n = , \* p < 0,05 ).
- Schnelle ERK-Phosphorylierung in transient mit EGFP-hMR oder EGFP transfizierten HEK-Zellen nach 5-minütiger Inkubation. Die Stimulation durch 10 nM Aldosteron in HEK-EGFP-MR-Zellen ist durch Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase (100 nM AG1478) oder Hemmung von c-Src (100 nM PP2) inhibierbar. Der PMA-Effekt ist MR unabhängig (n = 9, \* p < 0,05).

Die für die HEK-Zellen erhobenen Daten unterstützten die Ergebnisse, die für die CHO-Zellen gewonnen wurden. In beiden Zelltypen scheint die Aldosteron-abhängige ERK-Phosphorylierung durch eine Aktivierung des EGFR induziert zu werden, für die c-Src von Bedeutung ist. Passend dazu ließ sich mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper im Western Blot bei steigenden Aldosteronkonzentrationen eine zunehmende 55kDa-Bande erkennen, die aktiviertem c-Src entsprechen könnte (s. Abb. 44). Diese Hypothese wurde in weiteren Immunoblots mit einem pTyr-416-c-Src-spezifischen Antikörper bestätigt. Ebenfall durch Kurzinkubation mit Aldosteron auslösbar war eine vermehrte Phosphorylierung des EGFR am Tyrosin 1086, während sich die Gesamtkonzentration an EGFR nicht wesentlich veränderte.

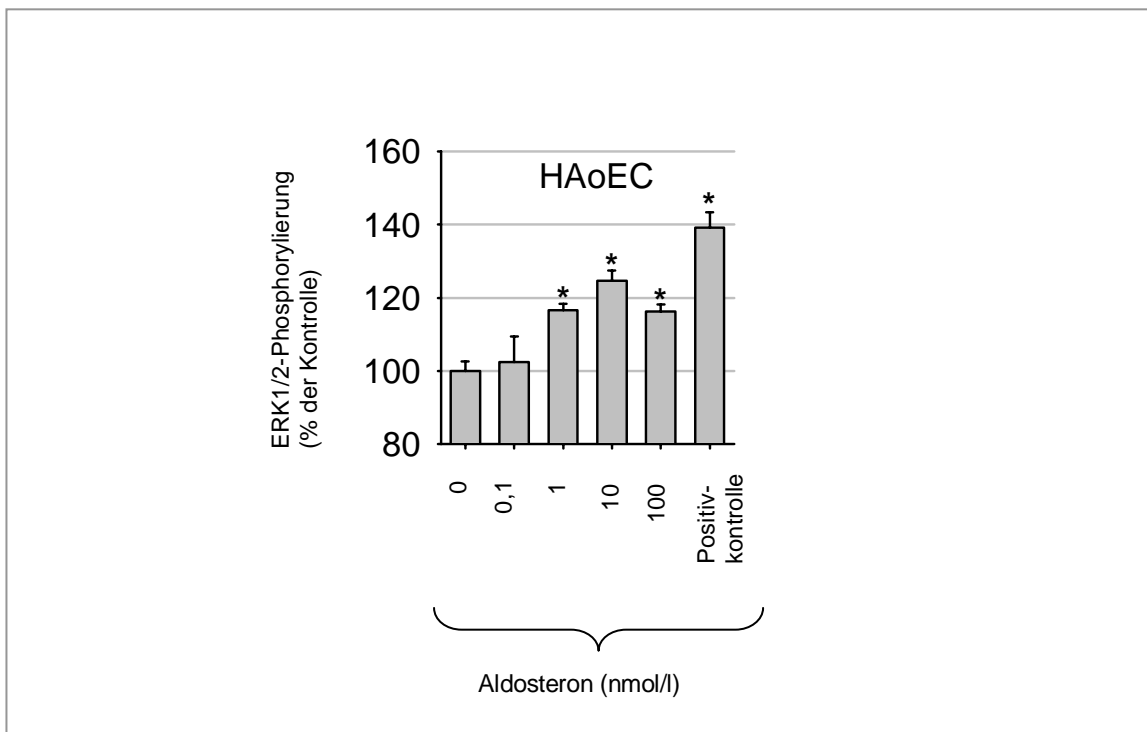


**Abb. 44**

- A) Im Western Blot erkennt man nach 5-minütiger Inkubation mit steigenden Aldosteronkonzentrationen die vermehrten Tyrosinphosphorylierung eines 55 kDa-Proteins (grauer Pfeil) ( $n = 2$ ).
- B) Mit steigenden Aldosteronkonzentrationen kommt es nach 5 min Inkubation auch zur vermehrten Phosphorylierung von c-Src, einem 55 kDa-Protein.
- C) Durch 5-minütige Aldosteroninkubation steigt die Tyrosinphosphorylierung des EGFR.

### 3.5.1.3. Primärzellen (HAoEC)

Als nächster Schritt wurden die Ergebnisse, die an undifferenzierten CHO- und HEK-Zellen gewonnen worden waren, an differenzierten humanen Zellen in Primärkultur überprüft. Weil Aldosteron besonders auf das Herz-Kreislaufsystem pathologisch wirkt, wurden humane Aortaendothelzellen gewählt. Wie in den Zellkulturlinien auch, konnte in HAoEC durch Aldosteron dosisabhängig eine Steigerung der ERK-Phosphorylierung induziert werden (s. Abb. 45). Da diese Zellen nur kurzzeitig ohne zusätzliche Wachstumsfaktoren und Hormone im Medium überleben, ist ihr Ausgangsniveau an MAP-Kinasen-Aktivität höher als bei den Zelllinien. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die geringere Stimulierbarkeit durch Aldosteron und die Positivkontrolle PMA.



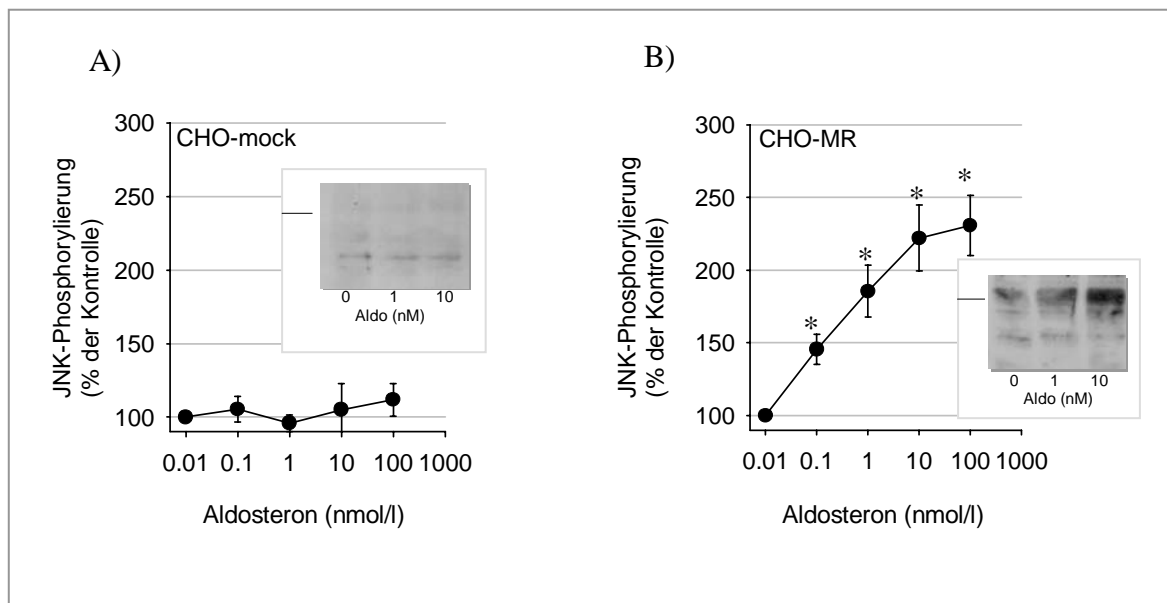
**Abb. 45**

Aldosteron beeinflusst die ERK1/2-Phosphorylierung in humanen Aortaendothelzellen (n = 6, \* p < 0,05, Positivkontrolle = 1  $\mu$ M PMA).

## 3.5.2. JNK-Phosphorylierung

### 3.5.2.1. CHO-Zellen

Um zu testen, ob weitere krankheitsrelevante MAP-Kinasen durch Aldosteron nicht-genotrop aktiviert würden, untersuchten wir neben der ERK1/2-Aktivierung auch die Phosphorylierung von JNK nach 5-minütiger Inkubation mit Aldosteron. Als Zellmodell wurden erneut CHO-Wildtyp-Zellen und stabil transfizierte CHO-hMR-Klone herangezogen. In Abwesenheit des hMR zeigte sich nach Aldosteroninkubation keine Zunahme der JNK-Aktivierung, wie aus den Daten von Direkt-ELISA und Western Blot ersichtlich wird. Bei Vorhandensein des hMR dagegen kam es bei Inkubation mit Aldosteron dosisabhängig zu einer Zunahme der JNK-Aktivierung (s. Abb. 46).

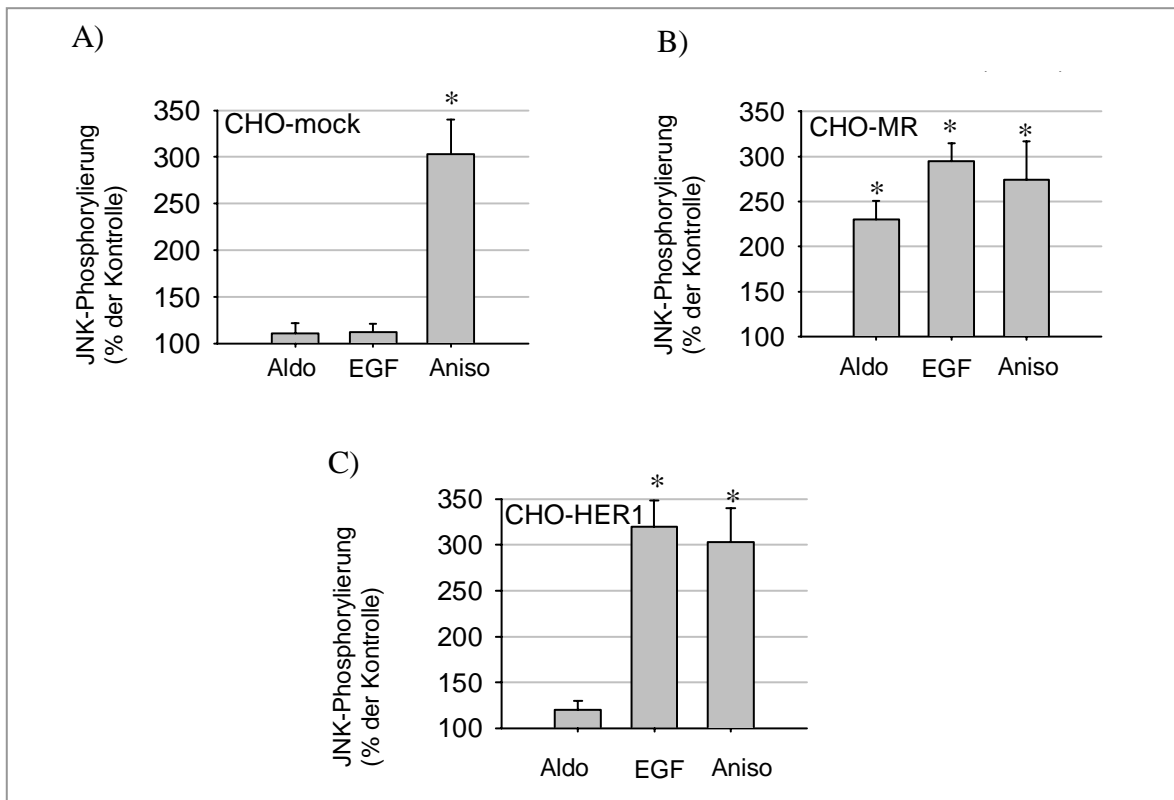


**Abb. 46**

Aldosteron-induzierte JNK-Phosphorylierung nach 5 min Inkubation ( $n \geq 9$ , \*  $p < 0,05$ ).

- A) In CHO-mock-Zellen kommt es durch Aldosteron nicht zu einer gesteigerten JNK-Phosphorylierung.
- B) In CHO-hMR-Klonen führt Aldosteron zu einer vermehrten JNK-Phosphorylierung.

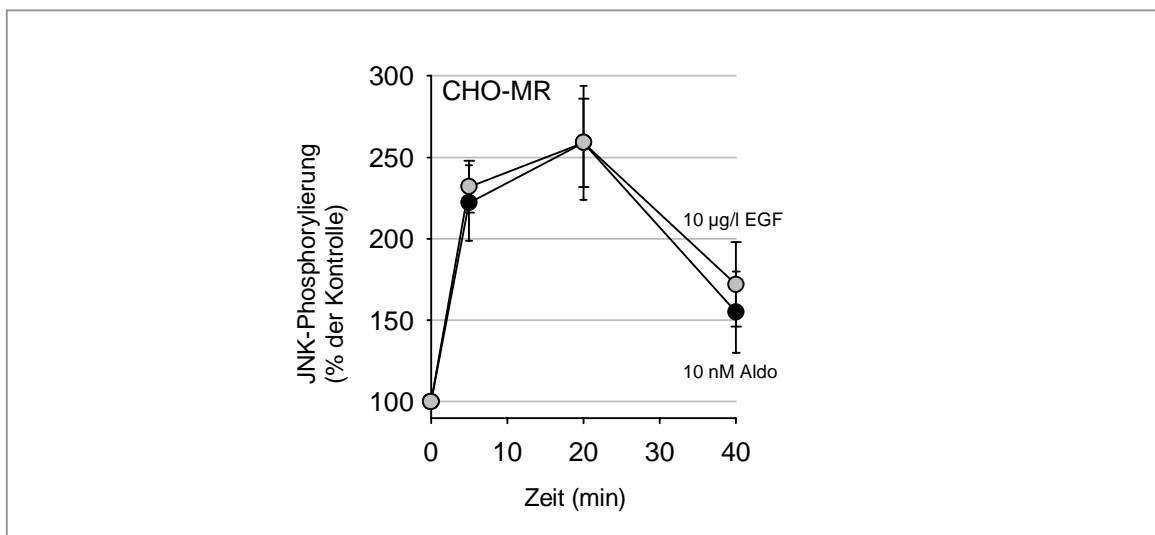
Außer Aldosteron stimulierte auch EGF in CHO-hMR-Zellen die JNK-Phosphorylierung (s. sAbb. 47). Zellen ohne hMR reagierten weder auf Aldosteron noch auf EGF mit gesteigerter JNK-Phosphorylierung, zeigten aber ein gutes Ansprechen auf die Positivkontrolle Anisomycin. Durch stabile Expression von EGFR ließ sich in stabilen CHO-HER1-Klonen eine EGF-, aber keine Aldosteron-induzierte JNK-Aktivierung erreichen.



**Abb. 47**

JNK-Phosphorylierung in CHO-mock-Zellen A), CHO-MR-Zellen B) oder CHO-HER1-Zellen C) nach 5 min Inkubation mit 10 nM Aldosteron, 10 µg/l EGF oder 1 µM Anisomycin ( $n \geq 9$ , \*  $p < 0,05$ ).

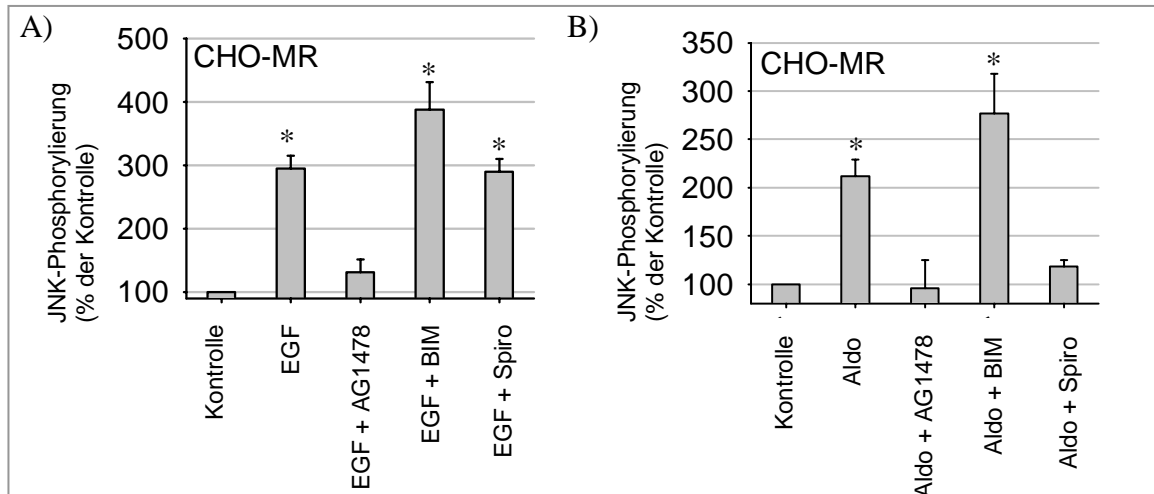
Im Zeitverlauf über 40 Minuten war die Aldosteron- und die EGF-induzierte JNK-Aktivierung in CHO-hMR-Zellen fast identisch; nach etwa 20 Minuten kam es zu einem Maximum bei etwa 250% der Kontrolle, gefolgt von einem steilen Abfall (s. Abb. 48).



**Abb. 48**

Zeitverlauf der Aldosteron- und EGF-induzierten JNK-Phosphorylierung in CHO-hMR-Zellen ( $n \geq 9$ ).

Die EGF-induzierte JNK-Phosphorylierung wurde durch EGFR-Tyrosinkinase-Hemmung (AG1478) inhibiert, nicht aber durch PKC-Hemmung (BIM) oder Spironolakton (s. Abb. 49). Im Gegensatz dazu war die Aldosteron-induzierte JNK-Phosphorylierung nicht nur durch AG1478, sondern auch durch Spironolakton hemmbar, während BIM keinen Effekt ausübte.

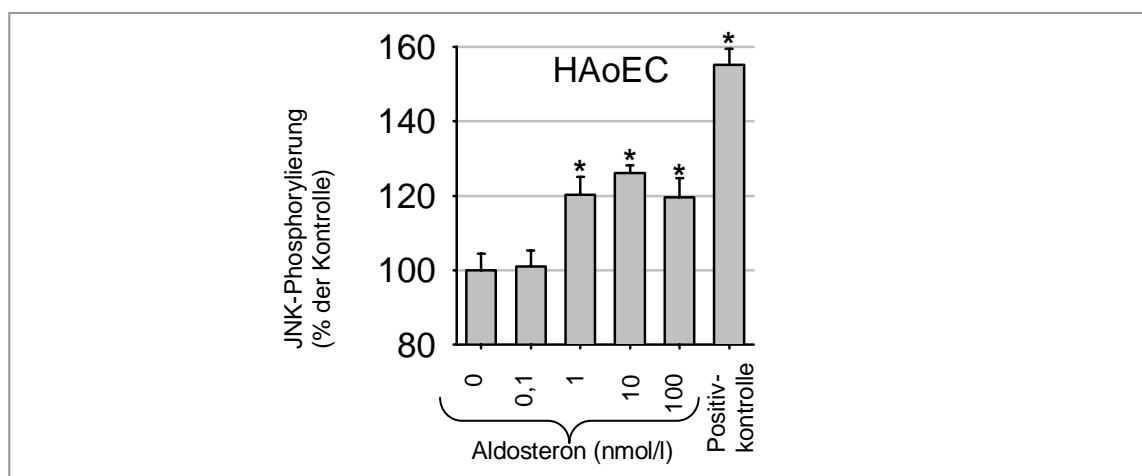


**Abb. 49** (n ≥ 9, \* p < 0,05).

- A) Hemmbarkeit der EGF-induzierten JNK-Phosphorylierung durch AG1478 (100 nM), aber nicht durch BIM (100 nM) oder Spironolakton (1 μM).
- B) Hemmbarkeit der Aldosteron-induzierten JNK-Phosphorylierung durch AG1478 (100 nM) und Spironolakton (1 μM), aber nicht durch BIM (100 nM).

### 3.5.2.2. Primärzellen (HaoEC)

Für die JNK-Phosphorylierung wurden die an CHO-Zellen gewonnenen Ergebnisse an differenzierten humanen Aortaendothelzellen in Primärkultur überprüft. Auch hier war das MAP-Kinasen-Ausgangsniveau bereits höher als in den Zelllinien und es kam nur zu einer geringen Steigerung der JNK-Phosphorylierung durch Aldosteron und die Positivkontrolle Anisomycin (s. Abb. 50).



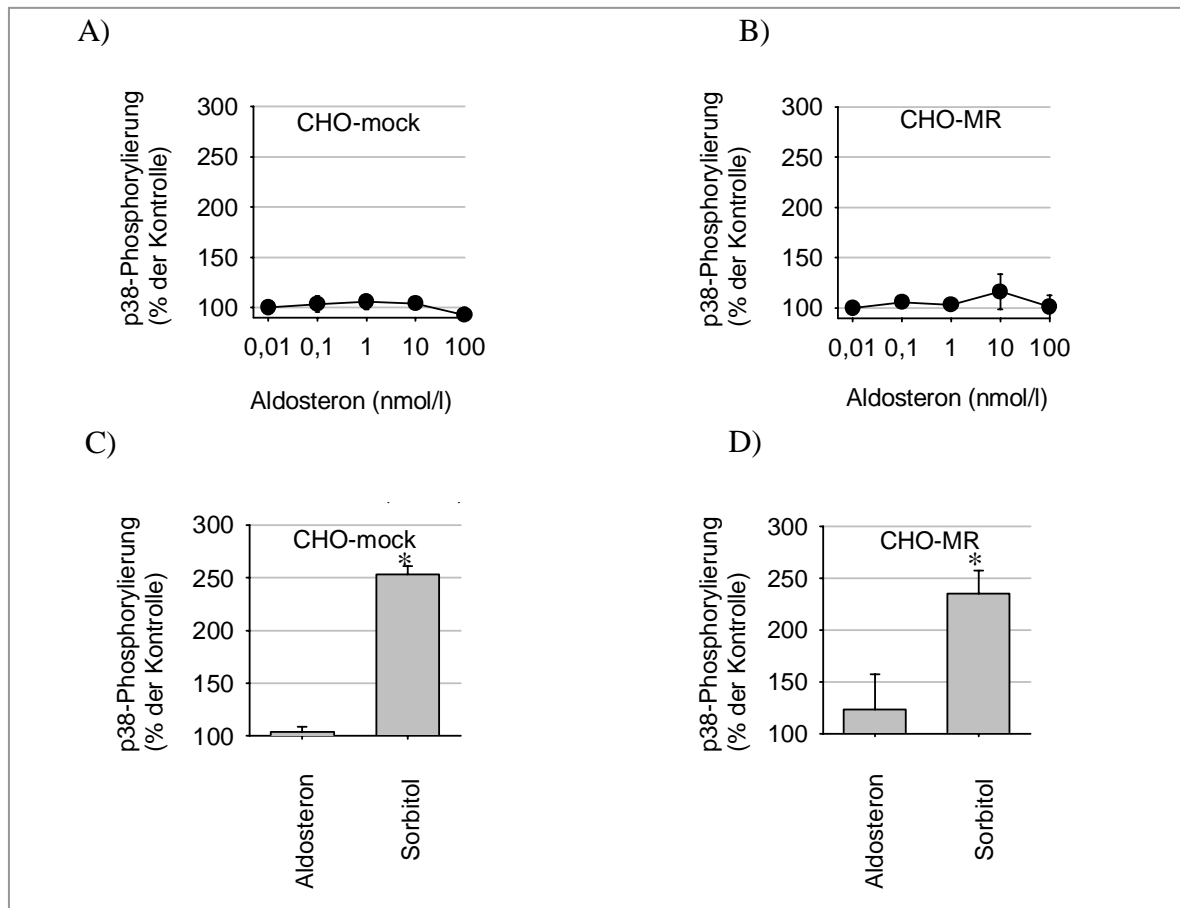
**Abb. 50**

Aldosteron beeinflusst die JNK-Phosphorylierung in humanen Aortaendothelzellen (n = 6, \* p < 0,05; Positivkontrolle = 1 μM Anisomycin).



### 3.5.3. p38-Phosphorylierung

Auf die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 hatte Aldosteron in unserem CHO-Zell-System keinen Einfluß, unabhängig davon, ob der hMR in die Zellen transfiziert worden war oder nicht (s. Abb. 51). Sorbitol diente als Positivkontrolle.

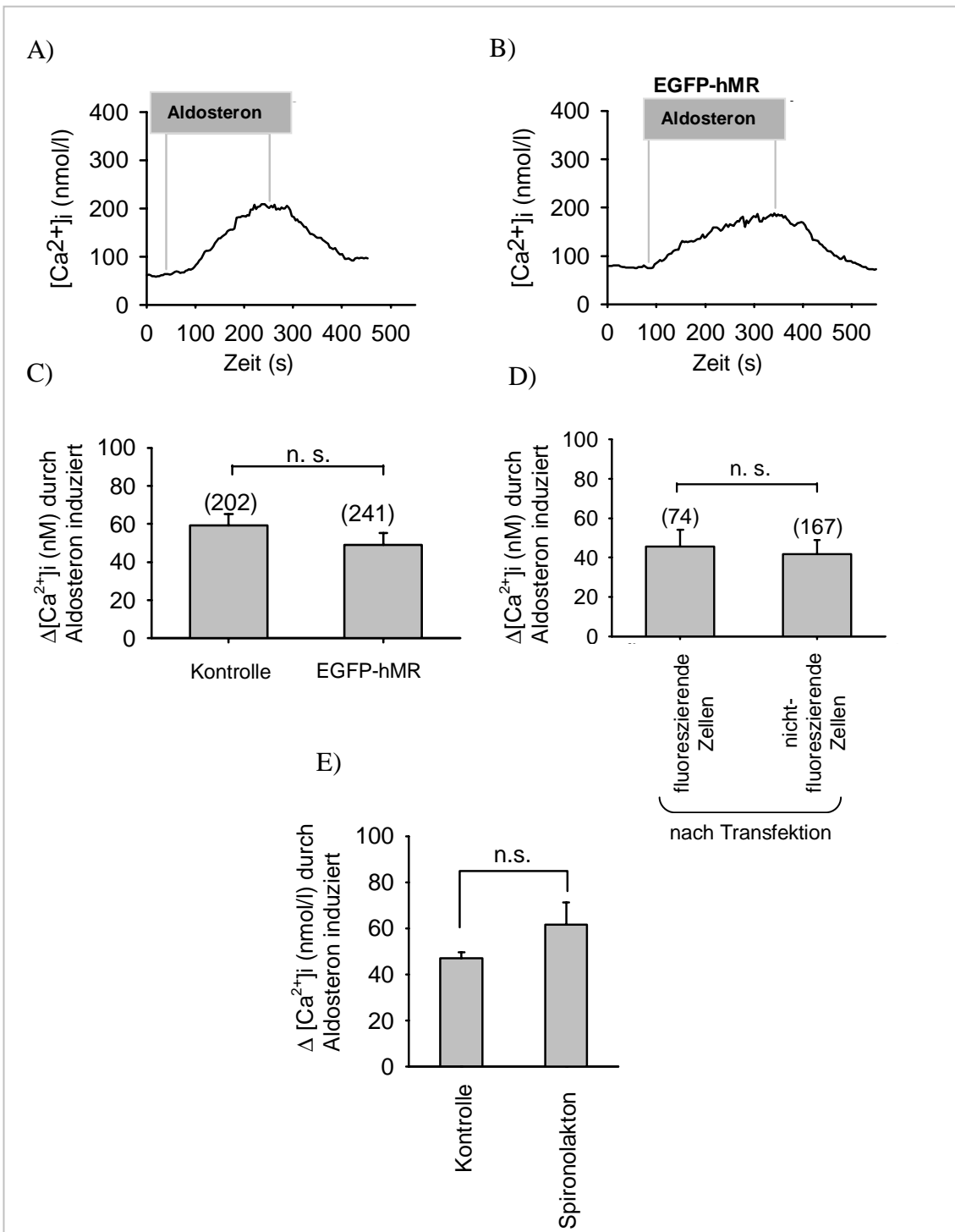


**Abb. 51**

p38-Phosphorylierung in CHO-mock- A), C) und CHO-MR-Zellen B), D) nach 5 min Inkubation mit 10 nM Aldosteron oder 600 mM Sorbitol ( $n \geq 9$ , \*  $p < 0,05$ ).

### 3.5.4. Calcium

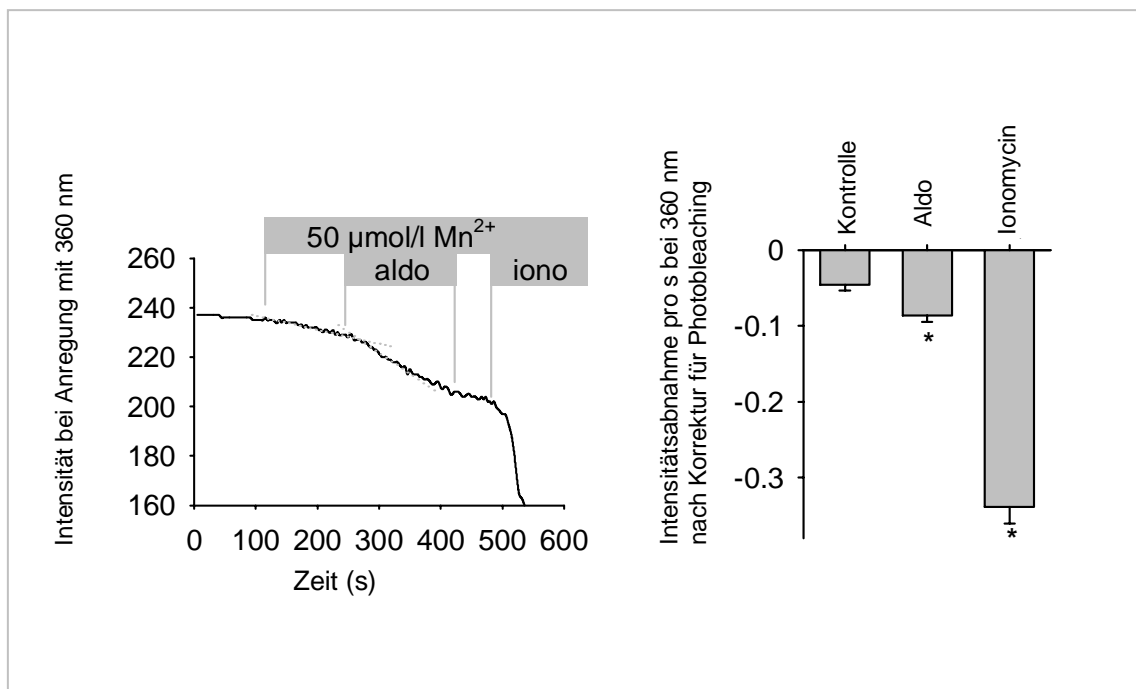
Messungen des intrazellulären Calciums mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fura-2 zeigten, dass es bei Inkubation mit 100 nM Aldosteron in HEK-Zellen zu einem leichten Anstieg des intrazellulären Calciums kommt (siehe Abbildung 52). Auch Versuche mit 10 nM Aldosteron lösten einen vergleichbaren Anstieg aus. Durch 100 nM Dexamethason dagegen kam es zu keinem nennenswerten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ( $\Delta Ca^{++} = 10 \pm 8$  nM bei  $n = 120$ ). In mit EGFP-hMR transfizierten und untransfizierten HEK-Zellen war ein vergleichbarer Calciumanstieg durch Aldosteron induzierbar. Spironolakton konnte den Aldosteron-induzierten Effekt nicht hemmen.



**Abb. 52**

Durch Aldosteron kommt es zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in HEK-Zellen mit oder ohne EGFP-hMR A) und B). Weder zwischen untransfizierten Kontrollzellen und transfizierten HEK-EGFP-hMR-Zellen C) noch zwischen mit EGFP-hMR-transfizierten HEK-Zellen mit oder ohne Fluoreszenz (und damit EGFP-hMR-Expression) bestand ein signifikanter Unterschied im Aldosteron-induzierten Anstieg des intrazellulären Calciums D). Durch Spironolaktin (1 μM) ließ sich der intrazelluläre Calciumanstieg durch Aldosteron nicht hemmen E) (n = 70, \* p < 0,05).

Um den Ursprung des erhöhten zytoplasmatischen Calciums zu ermitteln, führten wir einen Manganquench durch. Er beruht darauf, dass Mangan durch  $\text{Ca}^{++}$ -Kanäle ins Zytoplasma gelangt und dort ebenfalls an Fura-2 bindet. Je höher die Mangankonzentration in der Zelle, desto größer ist die Abnahme der Intensität des emittierten Lichts. Da Aldosteron die Abnahme beschleunigte, wird der intrazelluläre Calciumanstieg wahrscheinlich durch einen Calciuminflux verursacht. Das Calcium-Ionophor Ionomycin diente als Positivkontrolle.



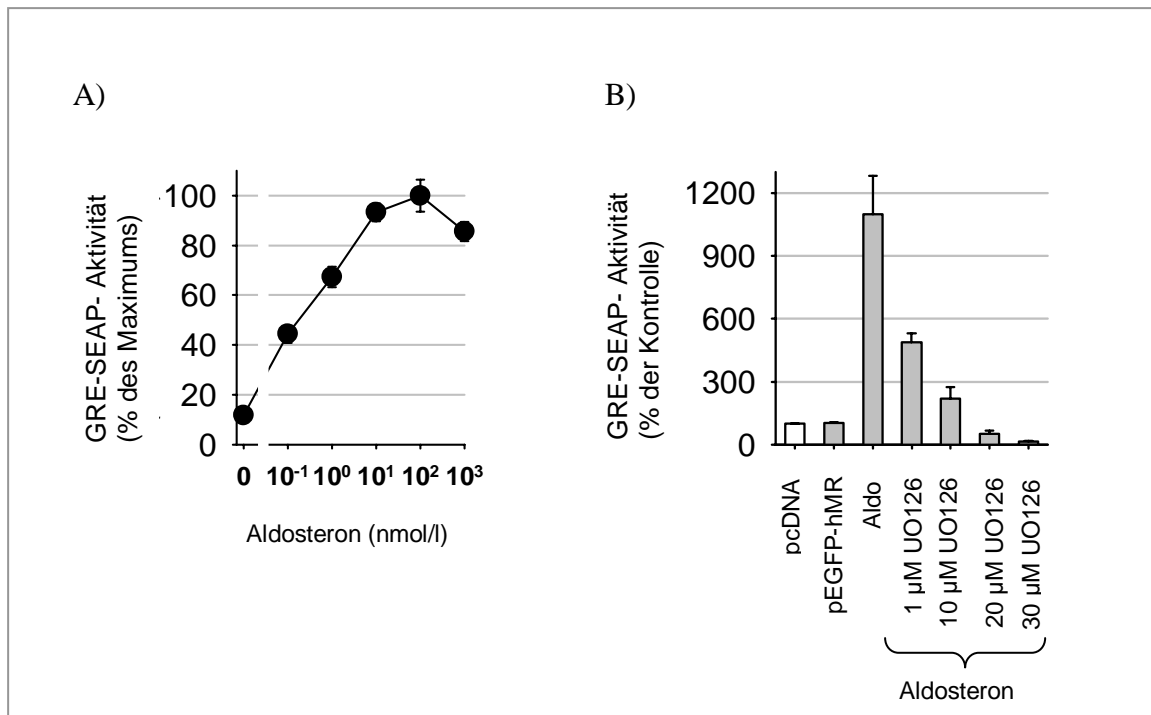
**Abb. 53**

Manganquench. Aldosteron verstärkt den Quenching-Effekt des Mangans. Ionomycin (1 μM), ein Calciumionophor, dient als Positivkontrolle (n = 30, \* p < 0,05).

*Unsere Untersuchungen zeigen also, dass Aldosteron nicht-genotrop die MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK1/2 aktivieren und die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen kann. Hierbei ließ sich die MR-abhängige ERK-Phosphorylierung durch Hemmer der EGFR-Signalkaskade und der Tyrosinkinase c-Src inhibieren. Die JNK-Aktivierung war ebenfalls MR- und EGFR-vermittelt. Auf die Phosphorylierung von p38 hatte Aldosteron keinen Einfluß. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration durch Aldosteron konnte auch in Zellen ohne MR beobachtet werden, so dass zwischen MR- und nicht-MR-vermittelte nicht-genotrope Effekte des Aldosterons unterschieden werden muss.*

### 3.6. Einfluß der nicht-genotropen auf die genomischen Aldosteron-Effekte

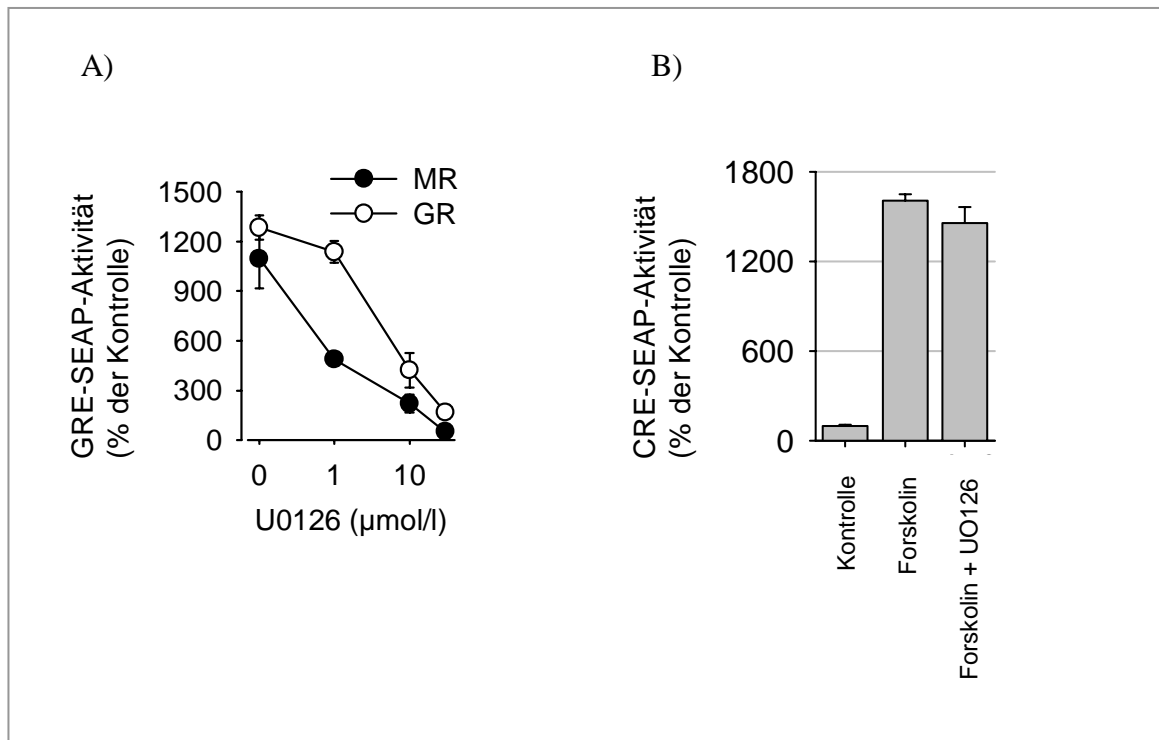
Zunächst ermittelten wir die Aldosteronkonzentration für eine maximale Transaktivierungsaktivität nach 24 h in unserem GRE-SEAP-Reporter-Gen-Assay. Diese lag bei etwa 100 nM Aldosteron. Um die Wirkung der nicht-genotropen Effekte auf die genotropen zu untersuchen, stimulierten wir daher die Zellen langfristig mit 100 nM Aldosteron und hemmten die nicht-genotropen Effekte durch Inkubation mit dem MEK-Inhibitor UO126. Hierbei kam es zu einer dosisabhängigen Hemmung der Transaktivierungsaktivität im GRE-SEAP-Assay (s. Abb. 54).



**Abb. 54**

- A) Aldosteron hat im GRE-SEAP-Reporter-Assay seine höchste Transaktivierungsaktivität bei etwa 100 nM (n = 12, 24 h Inkubation).
- B) Inhibition von MEK durch UO126 hemmt dosisabhängig die Transaktivierungsaktivität von Aldosteron im GRE-SEAP-Reporter-Assay (n = 9).

Allerdings ließ sich auch die dexamethasoninduzierte Transaktivierung des hGR durch UO126 inhibieren, wenn auch die halbmaximale Hemmung erst bei 5fach höheren Werten auftrat (s. Abb. 55). Um eine unspezifische Interaktion von UO126 mit dem SEAP-Reporter-Konstrukt auszuschließen, untersuchten wir die forskolinabhängige Aktivierung von CREB mit einem CRE-SEAP-Konstrukt. UO126 hatte auf die Transaktivierung von CRE durch Forskolin keinen Effekt, wodurch eine unspezifische Interaktion zwischen SEAP-Reporter-Konstrukten unwahrscheinlich wird.

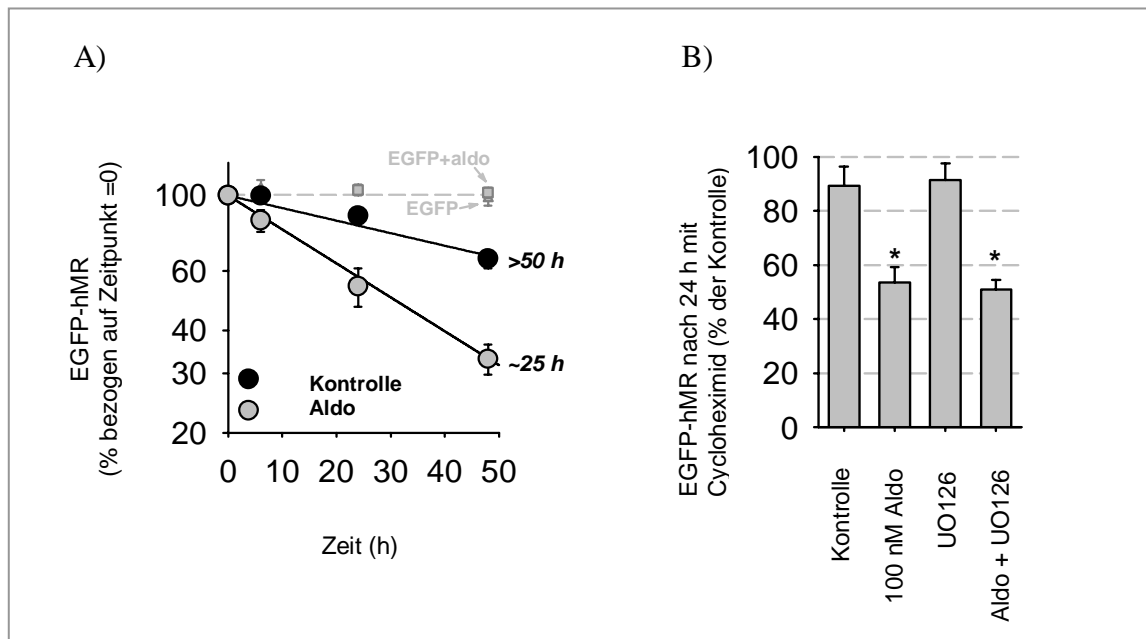


**Abb. 55**

- A) Inhibition von MEK durch UO126 hemmt dosisabhängig die Transaktivierungsaktivität von Aldosteron und von 100 nM Dexamethason im GRE-SEAP-Reporter-Assay (n = 9).  
 B) Inhibition von MEK durch UO126 hat keinen Einfluß auf die Forskolin-induzierte CRE-SEAP-Transaktivierung (n = 3; 10 μM Forskolin).

Eine Inhibition der nicht-genotropen Effekte scheint zu einer Hemmung der klassischen genomischen Effekte des hMR zu führen. Dies könnte zum Beispiel über eine Beschleunigung des Abbaus des hMR zustande kommen oder über eine Hemmung der Translokation des hMR in den Kern. Um die erste Möglichkeit zu untersuchen, bestimmten wir die Abbaugeschwindigkeit des EGFP-hMR nach Hemmung der Proteinneusynthese durch Cycloheximid. Wie Abb. 56 zeigt, wird der EGFP-hMR in Anwesenheit von Aldosteron wesentlich schneller abgebaut als in steroidfreier Umgebung (Halbwertszeit mit Aldosteron ca. 25 h, ohne Aldosteron > 50 h). Der Abbau von EGFP dagegen erfolgte langsamer und war

unabhängig von Aldosteron. Weder in aldosteronhaltigem noch in aldosteronfreiem Medium zeigte UO126 einen zusätzlichen Effekt auf den Abbau des EGFP-hMRs.

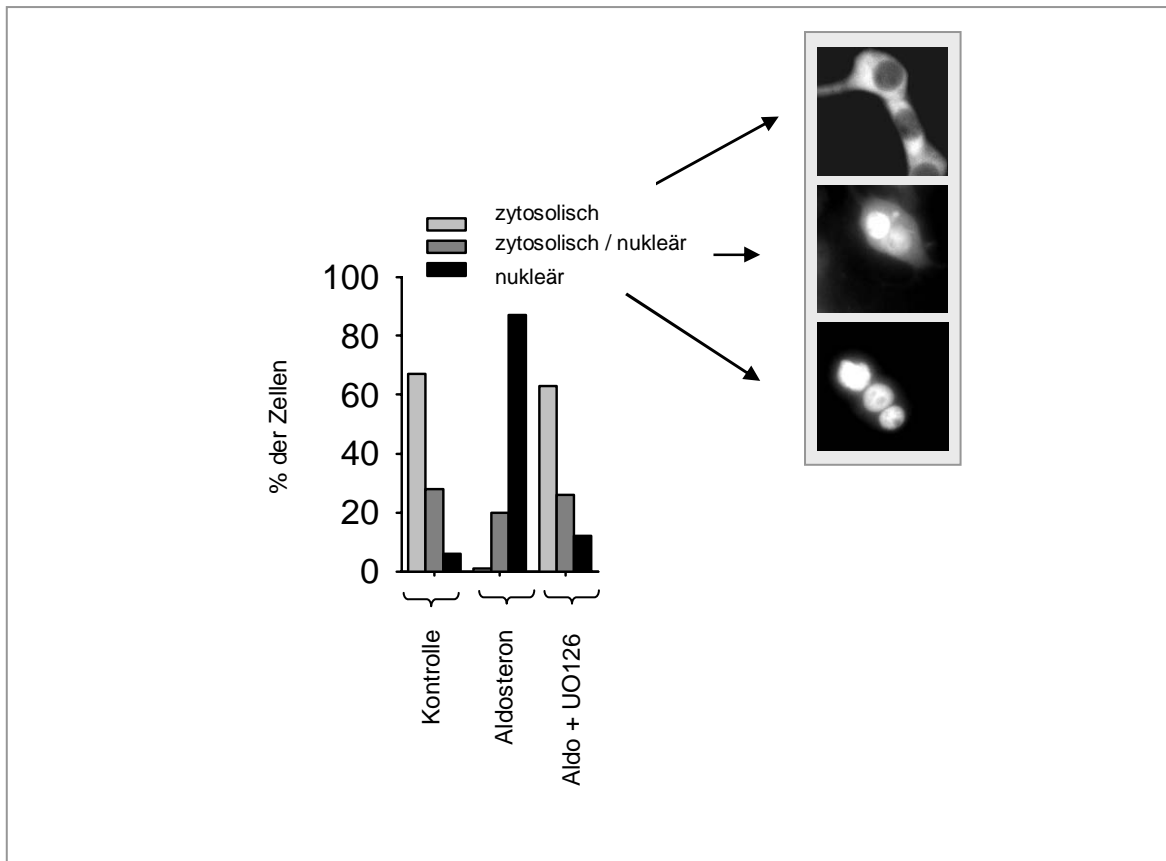


**Abb. 56**

Vergleich des EGFP-hMR-Abbaus nach Inkubation mit dem Proteinsynthesehemmer 10  $\mu$ M Cycloheximid.

- A) Der Abbau von EGFP-hMR wird durch 100 nM Aldosteron beschleunigt, während EGFP Aldosteron-unabhängig wesentlich langsamer abgebaut wird (n = 6).
- B) Aldosteron beschleunigt den Abbau des EGFP-hMRs, während 10  $\mu$ M UO126 keinen Einfluß auf den Abbau hat (n = 6, \* p < 0,05).

Als weitere Möglichkeit untersuchten wir mit Fluoreszenzmikroskopie die Verteilung des EGFP-hMR innerhalb der Zellkompartimente (s. Abb. 57). In HEK-Zellen in steroidfreiem Medium war der Großteil der Fluoreszenz im Zytoplasma unter Aussparung der Zellkerne zu finden. Nur ein geringerer Teil der Zellen zeigte eine Fluoreszenz im Kern und im Zytoplasma und ein noch geringerer Teil eine Fluoreszenz ausschließlich im Kern. Genau umgekehrt verhielt sich die Verteilung des hMR bei Inkubation mit Aldosteron, so dass bei etwa 90% der Zellen die Fluoreszenz im Kern anzutreffen war. Wenn neben Aldosteron zusätzlich mit UO126 inkubiert wurde, erhielt man wieder eine Verteilung, die sehr der ohne Aldosteron ähnelte. Dies lässt auf eine Hemmung der Kerntranslokation des hMR durch UO126 schließen. Umgekehrt bedeutet das, dass die nicht-genotropen MR-Effekte den zytoplasmatisch-nukleäre Transport des hMR unterstützen und so die genomischen MR-Effekte fördern.



**Abb. 57**

Intrazelluläre Verteilung des EGFP-hMR in HEK-Zellen (Zellen pro Versuchsbedingung = 300). Das durch 100 nM Aldosteron ausgelöste Shuttling des EGFP-hMR vom Zytoplasma in den Kern wird durch 10  $\mu$ M UO126 gehemmt.

*Folglich kommt es in unserem Modell durch nicht-genotrope, EGFR-vermittelte Aldostereffekte zu einer Erhöhung der Kerntranslokation des MR. Hierdurch stimulieren die nicht-genotropen Effekte die genomische Wirkung des Aldosterons.*

*Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse:*

- 1. Aldosteron führt MR-vermittelt zu einer vermehrten EGFR-Expression in vitro und in vivo.*
- 2. Die vermehrte EGFR-Expression wird über eine Steigerung der EGFR-Promotoraktivität vermittelt, an der die A/B-Domäne des MR und sowohl die -316-(-163)-bp- als auch die -163-(-1)-bp-Abschnitte des EGFR-Promotors mitwirken.*
- 3. Aldosteron führt EGFR-vermittelt zu einer vermehrten Fibronektinsekretion und verstärkt außerdem die Fibronektinsekretion, die durch EGF ausgelöst wird.*
- 4. Aldosteron wirkt durch eine vermehrte EGFR-Expression und ERK-Phosphorylierung einer übermäßigen Natriumresorption am renalen Sammelrohr entgegen und bildet so eine negative Feedbackschleife mit der die eigene Wirkung limitiert wird.*
- 5. Aldosteron löst über nicht-genotrope Effekte eine vermehrte ERK- und JNK-Phosphorylierung aus, die MR- und EGFR-vermittelt ist.*
- 6. Die nicht-genotropen EGFR-vermittelten Aldosteroneffekte führen zu einer Stimulierung der genomischen Aldosteronwirkungen über eine verstärkte Kerntranslokation.*



## 4. Diskussion

### 4.1. Aldosteron-induzierte EGFR-Expression

*Aldosteron und EGFR sind beide an pathophysiologischen Veränderungen im kardiovaskulären und renalen System beteiligt.*

Seit die klinischen Studien RALES und EPHEsus die pathologische Aldosteronwirkung im kardiovaskulären System beim Menschen eindrucksvoll belegt haben, hat die Aldosteronforschung eine regelrechte Renaissance erlebt<sup>(167;168)</sup>. Tierexperimentelle und klinische Daten zeigen, dass erhöhte Aldosteronspiegel mit Fibrose, vaskulärem und ventrikulärem Remodeling, Entzündungsreaktionen und vaskulärer Dysfunktion einhergehen und das nicht nur im Herzkreislaufsystem, sondern auch in der Niere<sup>(69;161;174;180;346-349)</sup>. Die diesen krankhaften Veränderungen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unerforscht. Da der EGFR an sich die Entstehung von Hypertrophie und Fibrose fördert und als heterologer Signaltransduktor für verschiedene vasoaktive Peptide mit G-Protein-gekoppelter Signaltransduktion entscheidend ist, ist eine Interaktion zwischen dem MR-Signaling und der EGFR-Signalkaskade ein attraktiver Erklärungsansatz für die Entstehung der pathophysiologischen Effekte von Aldosteron<sup>(337;338;350;351)</sup>. Bei den Peptiden mit EGFR-vermittelter Signaltransduktion mit pathophysiologischer Relevanz haben sich besonders Endothelin-1, Angiotensin-II und Phenylephrin hervorgetan<sup>(302-304;337;352-355)</sup>. Es wird angenommen, dass sie über mehrere Zwischenschritte zu einer Aktivierung von Matrixmetalloproteasen und Abspaltung membrangebundener Liganden des EGFR wie z.B. HB-EGF führen<sup>(303)</sup>. Passend dazu lässt sich in vitro durch pharmakologische Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen (MMP) oder durch dominant negative MMP-Konstrukte die EGFR-Transaktivierung und damit assoziierte vermehrte Proteinsynthese hemmen<sup>(327-329;329)</sup>. Durch pharmakologische EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (AG1478) und Antisense-Oligodeoxynukleotide gegen den EGFR lässt sich in Rattenhypertoniemodellen in VSMC in vitro bzw. in vivo die EGFR- und ERK-Phosphorylierung reduzieren<sup>(305;339)</sup>. Ferner konnte in vivo durch MMP-Inhibition eine linksventrikuläre Hypertrophie mit Kardiomyozytenvergrößerung und Fibrose sowie ein Blutdruckanstieg verhindert werden. Auch für die Bedeutung des EGFR bei der vasokonstriktischen und fibrinogenesefördernden Wirkung von Endothelin-1 und der hypertrophen und fibrotischen Wirkung von Angiotensin II gibt es verschiedene Hinweise, die auf pharmakologischen

Inhibitoren, Überexpressionsexperimenten oder verminderter funktioneller Expression vom EGFR bzw. dem AT1-Rezeptor beruhen<sup>(328;337;353;356-358)</sup>.

*Zwischen den Signalwegen von Aldosteron und EGFR findet eine Interaktion mit pathophysiologischer Bedeutung statt.*

Erste Hinweise für eine Interaktion zwischen Aldosteron und EGFR stammen von Zellkulturexperimenten in denen Zellen mit Mineralocorticoiden für EGF sensibilisiert werden konnten<sup>(359;360)</sup>. Eine Bedeutung dieser Interaktion für die Entstehung von Herzhypertrophie und kardiovaskulärem Remodeling wurde aufgrund von Rattenversuchen postuliert. Für die Entstehung der Hypertrophie sollen verschiedene intrazelluläre Signalwege unter Beteiligung der PKD und der PI3-Kinase-p100 $\delta$  relevant sein. Es konnte eine vermehrte Expression der Kollagengene Col1A1, Col1A2 und Col3A1 sowie von TGF- $\beta$ 1, CTGF und PAI nachgewiesen werden. Auch eine gesteigerte Aktivierung von p38, ERK1/2 und den Matrixmetalloproteasen 2 und 9 soll bei der pathophysiologischen Aldosteronwirkung eine Rolle spielen, ebenso wie eine Hemmung der induzierbaren NO-Synthase<sup>(361-365)</sup>. Die Bedeutung von Mineralocorticoiden für vaskuläres Remodeling wird auch dadurch deutlich, dass SHRSP durch Spironolakton oder den ACE-Inhibitor Captopril ohne Blutdruckveränderungen weniger häufig spontane zerebrale Infarkte erleiden. Die Captopril-Effekte sind durch Gabe von Mineralocorticoiden aufhebbar, so dass der positive Effekt wahrscheinlich durch verminderte Aldosteronsynthese entsteht. Des Weiteren liegen Signalmoleküle der pathologischen Aldosteronwirkung wie NF- $\kappa$ B und ERK1/2 stromabwärts der EGFR-Signalkaskade<sup>(359;366;367)</sup>. Eine synergistische Wirkung von Ang II und Aldosteron, die u.a. durch den EGFR und eine vermehrte ERK-Aktivierung zustande kommt, wird ebenfalls in der Literatur beschrieben und führt z.B. zu einer vermehrten Proliferation in VSMC<sup>(348;368)</sup>. Durch Hemmung der Aldosteron-Synthase oder Adrenalectomie können Ang-II-induzierte Endorganschäden in Rattenhypertoniemodellen wirkungsvoll verhindert werden<sup>(68)</sup>. In vivo verstärken Mineralocorticoide die EGF-induzierte Kontraktion von Arterien bei gleichzeitiger Zunahme der EGFR-mRNA<sup>(340)</sup>. Immunhistochemische Untersuchungen deuten ferner an, dass es zusätzlich zu einer Erhöhung der EGFR-Proteinsynthese kommt<sup>(345)</sup>. Bei verschiedenen experimentell-induzierten oder genetischen Rattenhypertoniemodellen konnte im Vergleich zu Wildtyptieren eine vermehrte Arterienkontraktion durch EGF ausgelöst werden. Als mögliche Ursache für diese verstärkte EGF-Wirkung wird eine erhöhte Aldosteronkonzentration in diesen hypertonen Ratten diskutiert. Ebenso wurden für SHRSP-Ratten erhöhte

Plasmaaldosteron- und MR-mRNA-Werte in Gefäßen gemessen. Der Vergleich von mit DOCA und Salz behandelten Wistar und Wistar-Furth-Ratten zeigt, dass nicht die erhöhten Blutdruckwerte an sich für das vermehrte Ansprechen auf EGF verantwortlich sind. Interessanterweise kann in SHRSP durch den MR-Antagonisten Spironolakton die Größe eines ischämischen cerebralen Insults ohne signifikante Verringerung der Blutdruckwerte verkleinert werden, vermutlich durch Verminderung des vaskulären Remodelings<sup>(341)</sup>. Gleichzeitig kommt es zu einer Verringerung der EGFR-mRNA-Konzentration.

Auch bei unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass Aldosteron EGFR-vermittelt zu einer Steigerung der Fibronektinsekretion in HAoSMC führt. Die Fibronektinsekretion ist hierbei ein Hinweis auf vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix, wie sie bei Fibroseentstehung oder Remodelingprozessen vorkommt. Aldosteron entfaltet seine Hauptwirkung erst im Zusammenspiel mit EGF, was zu dem Befund passt, dass Aldosteron besonders in vorgeschädigten Organen pathophysiologische Wirkung besitzt. Insgesamt gibt es also verschiedene Hinweise für eine pathophysiologisch relevante Interaktion zwischen Aldosteron/MR und der EGFR-Signalkaskade. Diese wollten wir näher untersuchen.

*Aldosteron führt zu einer Steigerung der EGFR-Expression in einem heterologen Expressionssystem (CHO-Zellen).*

Uns interessierte zunächst, ob es durch ligandengebundenen MR zu einer vermehrten EGFR-Expression kommt. Hierfür entwickelten wir ein heterologes Expressionssystem aus CHO-Zellen, die stabil mit hMR transfiziert worden waren. Diese Zellen stammen aus dem Ovar des chinesischen Hamsters und besitzen keinen nachweisbaren MR. Insgesamt ermöglichte uns dieses Zellkulturmodell unter sehr kontrollierten Bedingungen Untersuchungen durchzuführen und durch Vergleiche mit scheintransfizierten CHO-Zellen die Bedeutung des MR an den erhaltenen Ergebnissen zu evaluieren. Um weitgehend auszuschließen, dass bei der Klonierung der stabilen Zellen unbeabsichtigte Merkmale selektioniert wurden, untersuchten wir jeweils verschiedene Zellklone. Bei keinem der untersuchten CHO-pcDNA-Zellklone war der EGFR im Western Blot oder in der Immunfluoreszenz nachweisbar; dagegen wurde er bei allen CHO-hMR-Klonen deutlich exprimiert. Diese MR-induzierte EGFR-Expression trat dosisabhängig in Anwesenheit von Aldosteron oder Serum aber nicht in serumfreiem Medium auf. Eine maximale EGFR-Proteinexpression ließ sich durch FCS-haltiges Medium erzielen, vermutlich aufgrund der hohen Steroidkonzentration im Serum oder aufgrund von weiteren, die EGFR-Expression erhöhenden Faktoren. Durch den MR-Antagonisten Spironolakton konnte die vermehrte EGFR-Expression dosisabhängig gehemmt

werden. Somit ist von einer MR-abhängigen EGFR-Induktion auszugehen. Die vermehrten EGFRs waren hierbei funktionell intakt, denn sie führten nach kurzfristiger EGF-Inkubation zu einer gesteigerten stromabwärtsgelegenen ERK-Phosphorylierung. Durch entsprechende pharmakologische Inhibitoren der EGFR-Sigalkaskade, UO126 und AG1478, konnten wir diesen Effekt hemmen. Allerdings war eine gesteigerte ERK-Phosphorylierung auch durch kurzfristige Aldosteroninkubation auslösbar, falls der MR vorhanden war. Dieser schnelle Effekt könnte auf eine vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivierung vorhandener EGFRs durch ligandengebundene MRs erklärt werden (s. nicht-genotrope Effekte).

Einige der klassischen MR-induzierten Effekte sind unspezifisch und können ebenfalls durch den Glucocorticoidrezeptor ausgelöst werden, da sich beide ein HRE teilen. Dies ist bei der EGFR-Induktion nicht möglich, wie Versuche mit stabilen CHO-hGR-Klonen zeigten. Auch eine Steigerung der ERK-Phosphorylierung durch andere Peptidhormone als EGF war nicht möglich. Insgesamt konnten wir also zeigen, dass Aldosteron in Anwesenheit des MR zu einer vermehrten Expression von funktionell intaktem EGFR führt.

*Aldosteron führt zu einer Steigerung der EGFR-Expression in endogen den MR exprimierenden Zelllinien und Primärkulturen.*

Um die Gültigkeit unserer Hypothesen auch in anderen Systemen zu überprüfen, untersuchten wir die Aldosteron-induzierte EGFR-Expression in endogen den MR exprimierenden MDCK-C7- und MDCK-C11-Zellen. Die C7-Zellen zeichnen sich durch eine Aldosteron-sensible  $K^+$ -Sekretion sowie einen hohen transepithelialen Widerstand aus und ähneln daher den Hauptzellen des Sammelrohres<sup>(369)</sup>. Die C11-Zellen dagegen besitzen einen intrazellulären pH von 7,16, einen niedrigen transepithelialen Widerstand und sezernieren Chlorid ins apikale Medium. Durch Aldosteron oder cAMP lässt sich bei C11-Zellen eine Protonensekretion induzieren. Der C11-Klon ähnelt daher den Schaltzellen des renalen Sammelrohres<sup>(369)</sup>. Auch in diesen zwei Zelllinien lässt sich eine Aldosteron-induzierte EGFR-Expression zeigen. Dies trifft auch für renale proximale Tubulusepithelzellen (RPTEC) und humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen in Primärkultur zu, die den physiologischen Bedingungen im Organismus eher entsprechen und von Geweben stammen, an denen die pathophysiologischen Effekte von Aldosteron auch in vivo auftreten.

*Aldosteron führt zu einer Steigerung der EGFR-Expression in vivo.*

Als nächstes untersuchten wir die Wirkung von Aldosteron auf die EGFR-Expression in vivo an adrenaletomierten Ratten. Die mit Aldosteron substituierten Tiere zeigten eine Steigerung

der EGFR-Expression in der Niere, im linken Herzen und in der Aorta, also genau in den Organen, die bei erhöhten Aldosteronspiegeln von pathologischen Veränderungen betroffen sind. Die durch Substitution erreichten Aldosteron-Plasmaspiegel der adrenaletomierten Tiere lagen bei  $4,9 \pm 0,6$  nmol/l, also im leicht supraphysiologischen Bereich. Solche Werte können bei Stress oder pathologischer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems aber leicht erreicht werden. Dexamethason- statt Aldosteronapplikation bewirkte keine Erhöhung der EGFR-Expression, so dass auch in vivo der Effekt nicht durch den GR vermittelt werden kann und MR-spezifisch zu sein scheint. Da dies alles eine Induktion der EGFR-Expression durch Aldosteron-gebundenen MR unterstützt und dieser Mechanismus pathophysiologisch relevant sein könnte, untersuchten wir als nächstes den molekularen Mechanismus. Auch im Hinblick auf therapeutische Interventionen ist dieser von besonderem Interesse.

#### **4.2. Molekulare Grundlage der vermehrten EGFR-Expression**

*Aldosteron-gebundener MR interagiert mit dem EGFR-Promotor.*

Prinzipiell ist eine vermehrte EGFR-Expression entweder durch vermehrte Synthese oder verlangsamten Abbau denkbar. Um die Hypothese einer vermehrten Synthese zu überprüfen, untersuchten wir die Promotoraktivität des EGFR in Anwesenheit und Abwesenheit von hMR bzw. hGR in serumhaltigem Medium. Wir stellten fest, dass die EGFR-Promotoraktivität in Zellen mit hMR erhöht war, während der hGR keine vom Leervektor unterschiedliche Aktivierung auslöste. Der ligandengebundene MR stimuliert also am EGFR-Promotor die EGFR-Expression. Da der MR auf Proteinebene aufgrund seiner geringen Konzentration, seines raschen Abbaus und der unzureichenden kommerziellen Antikörper nur schlecht nachweisbar ist, konstruierten wir Plasmide mit unterschiedlichen hMR-Fähnchen und untersuchten ihre Expression. Weder mit einem His-Tag noch mit einem Anti-Xpress-Tag ließ sich der MR zuverlässig nachweisen, dafür aber mit einem EGFP-Tag. Der EGFP-MR hat auch den Vorteil, dass sein Verteilungsmuster und sein Expressionsgrad in der Fluoreszenzmikroskopie direkt nachweisbar sind. Da in CHO-Zellen das Zytoplasma-Kern-Verhältnis ungünstig und die erwartete MR-Expression gering ist, verwendeten wir für die nachfolgenden molekularen Untersuchungen pEGFP-hMR-transfizierte HEK-293-Zellen. Auch mit diesem neuen Modellsystem konnte eine aldosteronkonzentrationsabhängige Aktivierung des EGFR-Promotors bei Zellen mit EGFP-hMR im Reporter-Gen-Assay gezeigt werden.

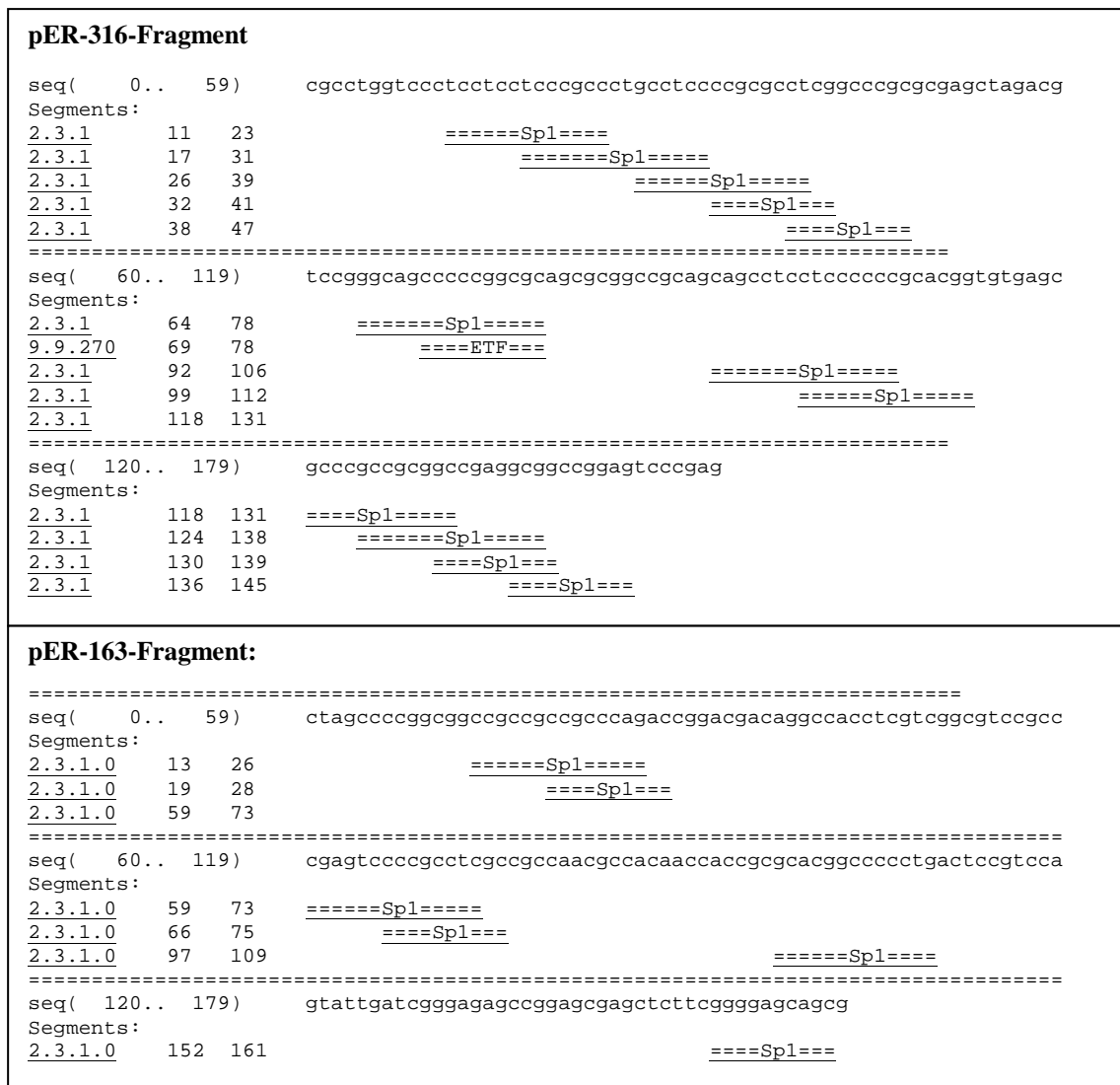
*Die EGFR-Promotorregionen -316-(-163) und -163-(-1) sowie die A/B-Domäne des MR sind an der Aldosteron-induzierte EGFR-Expression beteiligt.*

Um Hinweise für eine direkte Interaktion des hMR mit dem Promotor zu erhalten, entwickelten wir einen Chromatinimmunopräzipitationsassay. Nach Quervernetzung der DNA mit ihren Bindungsproteinen wurde EGFP-MR oder EGFP als Kontrolle immunopräzipitiert. In den Präzipitaten wurden anschließend durch PCR die gebundenen DNA-Fragmente analysiert. Da in Zellen mit hMR die PCR gegen den EGFR-Promotor eine starke Bande ergab, spricht dies für eine Interaktion zwischen MR und Promotor. Um den Interaktionsort näher einzugrenzen entwickelten wir Deletionskonstrukte des EGFR-Promotors und testeten ihre Aktivität in unserem EGFR-Promotor-Reporter-Gen-Assay. Wir identifizierten zwei Fragmente des EGFR-Promotors, die beide mit MR und Aldosteron eine gesteigerte Promotoraktivität aufwiesen, nämlich das pER-316- und das etwas schwächer wirksame pER-163 Fragment (s. Abb. 25). Anschließend konnten wir durch Versuche mit trunkierten MR-Konstrukten zeigen, dass die Domänen C, D, E und F des MR alleine nicht ausreichen, um pERLuc zu stimulieren. Wir konnten daher als wesentliche Interaktionspartner für die Aldosteron-induzierte EGFR-Expression die Basenpaare -316-(-163) und die Basenpaare-163-1 des EGFR-Promotors und die A/B-Domäne des MR identifizieren.

*Die durch Aldosteron/MR stimulierbaren EGFR-Promotor-Regionen besitzen kein klassisches GRE-Element.*

Zum EGFR-Promoter gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen. Er ist 1118 bp lang, sehr GC-reich, besitzt aber keine TATA oder CAAT-Box<sup>(370)</sup>. Er weist außerdem mehrere Sp1-Bindungsstellen sowie Bindungsstellen für den ETF (EGFR transcription factor) auf<sup>(371;372)</sup>. Zusätzlich besitzt der Promotor eine S1-Nuklease-sensitive Region, die ERDP-1 bindet (EGF responsive DNA binding protein)<sup>(373)</sup>. Auch für p53 sind mehrere Bindungsstellen bekannt<sup>(374;375)</sup>. Als Repressoren wurden zwei Faktoren identifiziert; der 128 kDa schwere ETR (EGF transcriptional repressor) und der mehrere Stellen des Promotors bindende GCF (GC factor)<sup>(376;377)</sup>. Es wurde bereits gezeigt, dass die Anzahl der EGF-Bindungsstellen durch Östrogen, Retinsäure und Schilddrüsenhormone beeinflussbar ist<sup>(378-380)</sup>. Ein Effekt des T3-Rezeptors wird durch Hemmung der Sp1-abhängigen Transkription aufgrund von überlappenden Bindungsstellen erreicht<sup>(381)</sup>. Phorbolster sollen über AP2 die EGFR-Transkription ebenfalls beeinflussen<sup>(382)</sup>. In dem pER-316-Fragment kann man anhand von Computeranalysen mit Alibaba2 (zugänglich über <http://www.gene-regulation.com>) kein

GRE aber mehrere Bindungsstellen für SP1 vorhersagen sowie eine zusätzliche für ETF (s. Abb. 58).



**Abb. 58** Computeranalyse: Suche nach Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in dem 153-bp-Fragment aus pER-316 und in dem 163-bp-Fragment aus pER-163 mit Alibaba2.

Über diesen Faktor ist noch nicht viel bekannt; man weiß allerdings, dass ETF an GC-reiche Sequenzen und auch mit niedrigerer Affinität an TATA-Elemente bindet. Nur in Promotoren ohne TATA- und CAAT-Box stimuliert ETF in vitro die Transkription. Interessanterweise besitzt der EGFR-Promotor in dem 153-bp-Bereich des pER-316 auch eine TC-reiche Region, die in ähnlicher Weise auch im Insulin-Rezeptor und im LDL-Rezeptor vorkommt. Sie ist Teil eines Sterol-regulierenden Elementes, an das ein nicht näher identifiziertes nukleäres Protein bindet. Weitere genauere Analysen des Promotorfragmentes scheinen mit Hinblick auf mögliche therapeutische Zielstrukturen sinnvoll, insbesondere um evtl. ein spezifisches

MRE (mineralocorticoid response element) zu ermitteln. Auch im pER-163-Fragment wurden keine klassischen GREs gefunden, sondern viele Bindungsstellen für SP 1. Mit einem anderen Algorithmus wurde eine zusätzliche AP-1 Bindungsstelle gefunden. Da es Hinweise für eine vermehrte AP-1 Aktivierung durch Mineralocorticoide gibt, wäre am pER-163-Fragment auch hierüber eine Steigerung der EGFR-Promotoraktivität denkbar<sup>(366)</sup>.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass die Interaktion zwischen MR und EGFR nicht über die klassische MR-DNA-Bindung an einem GRE zustande kommt, sondern über einen alternativen Mechanismus vermittelt wird, für den die A/B-Domäne des MR und die EGFR-Promotorfragmente aus pER-316 und pER-163 entscheidend sind.

### **4.3. Einfluß der Aldosteron-induzierten EGFR-Expression auf die Natriumresorption**

*Aldosteron erhöht die Natriumresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere.*

Eine der am besten untersuchten Eigenschaften des Aldosterons ist sein Einfluß auf die Natriumresorption im distalen Tubulus und Sammelrohr der Niere<sup>(383)</sup>. Hier bindet Aldosteron im Zytosol an den Mineralocorticoidrezeptor und führt über vorwiegend genomische Effekte zu einer vermehrten Expression von z.B. epithelialen Natriumkanälen (ENaC) und Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasen. Insgesamt wird über diesen Mechanismus die Natriumresorption begünstigt. Einzelheiten der Regulation der Natriumresorption sind erst zum Teil bekannt und Gegenstand aktueller Forschung (s. Abb. 60). So wurde vor kurzem gezeigt, dass es über eine Aldosteron-induzierte SGK-1-Expression zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Inaktivierung der Ubiquitinligase Nedd4-2 kommt<sup>(102;103)</sup>. Da Nedd4-2 den Abbau des ENaC durch Proteosomen induziert, führt Aldosteron so über einen verminderten Abbau des ENaC zu einer erhöhten Natriumresorption. Auch eine direkte Phosphorylierung der ENaC alpha-Untereinheit durch SGK-1 mit erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit des ENaC ist beschrieben worden<sup>(384)</sup>. Für die Aktivierung der SKG-1 ist eine PI3-Kinase-abhängige Phosphorylierung erforderlich, so dass weitere Hormone wie z.B. Insulin auch einen modulierenden Einfluss ausüben können<sup>(119)</sup>. Aldosteron selbst führt evtl. über k-ras ebenfalls zu einer vermehrten PI3-Kinase Aktivität<sup>(385)</sup>. Wie schon durch den milden, Aldosteron-resistenten Phänotyp der Sgk-knock-out-Mäuse angedeutet, müssen noch weitere Regulatoren des ENaC existieren<sup>(115)</sup>.

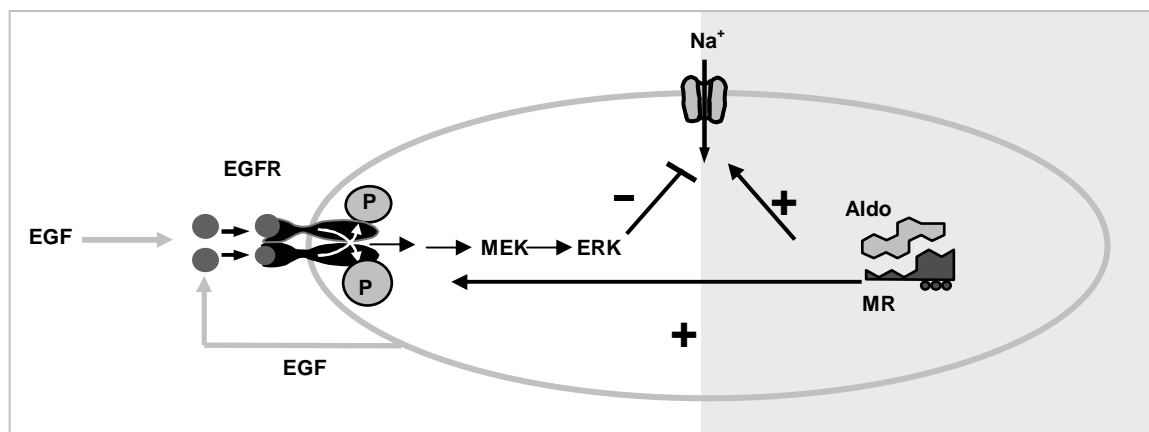
Eine weitere wichtige Eigenschaft von Aldosteron ist seine Fähigkeit, Peptidsignalwege wie den von Angiotensin II und EGF zu modulieren<sup>(359;368)</sup>. Interessanterweise ist auch für EGF ein Einfluss auf die Natriumresorption bekannt, der allerdings je nach Zelltyp und Versuchsbedingungen unterschiedlich ausfällt<sup>(386-390)</sup>. Uns interessierte daher, ob die EGF-



Signalkaskade auch einen Einfluss auf die Natriumresorption in den Aldosteron-regulierten Hauptzellen des Sammelrohres hat und ob es hier zu einer Aldosteron/MR-EGFR-Signalkaskaden-Interaktion mit Auswirkung auf die Natriumresorption kommt.

*Aktivierung der EGFR-Signalkaskade hemmt die Natriumresorption im Sammelrohr der Niere – Entstehung einer negativen Feedbackschleife.*

Die für diese Untersuchungen verwendeten C7-Zellen sind ein MDCK-Zellsubtyp, der durch eine Aldosteron-sensible  $K^+$ -Sekretion sowie einen hohen transepithelialen Widerstand gekennzeichnet ist und daher den Hauptzellen des Sammelrohres ähnelt<sup>(369)</sup>. Um Interaktionen mit dem ebenfalls in den Zellen vorhandenen Glucocorticoidrezeptor zu vermeiden, wurden Aldosteronkonzentrationen von 10 nM eingesetzt, die nur den höher affinen MR aktivieren sollten. In früheren Untersuchungen wurden häufig unphysiologisch hohe Aldosteronkonzentrationen von  $\geq 1 \mu\text{M}$  eingesetzt, bei denen eine MR-Spezifität nicht mehr gewährleistet werden kann. Daher ist die Interpretation der mit solch hohen Konzentrationen gewonnenen Ergebnisse, schwierig. Als Maß für ENaC-vermittelte Natriumresorption ist der durch Amilorid hemmbare Kurzschlussstrom geeignet. Etwas problematischer zu quantifizieren ist die Dombildung pro Fläche, die aber zur Bestätigung von Tendenzen gut geeignet ist. Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigte sich in unseren Untersuchungen, dass Aldosteron die Natriumresorption steigert.

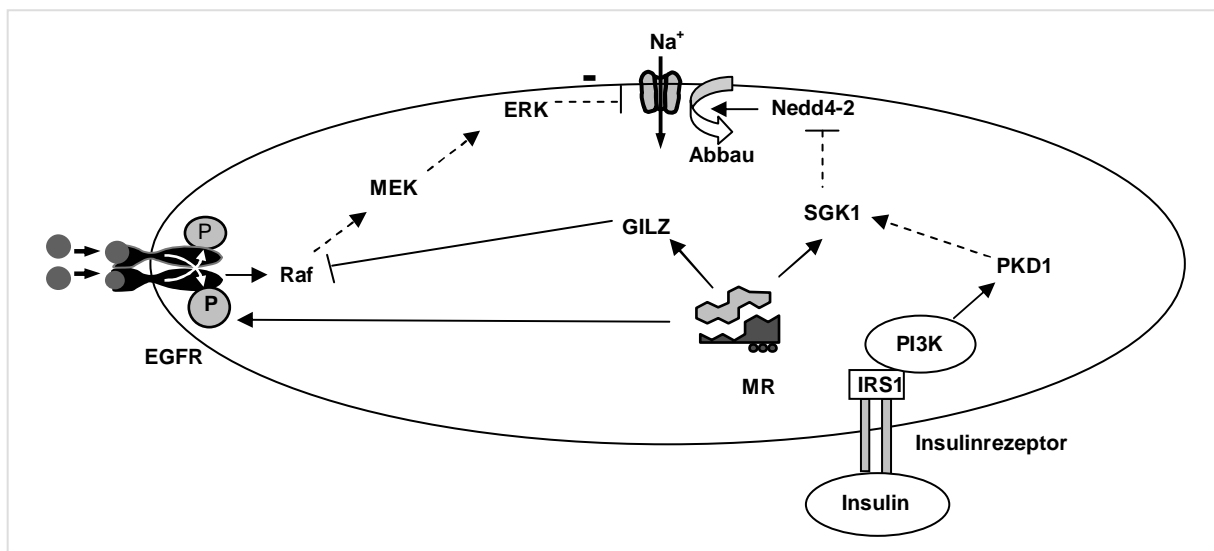


**Abb. 59**

Einfluss der EGFR-Signalkaskade und von Aldosteron auf die Natriumresorption in Hauptzellen des Sammelrohres (MDCK-C7-Zellen). Modell einer negativen Feedbackschleife: Einfluss der Aldosteron/MR-Interaktion mit der EGFR-Signalkaskade auf die Natriumresorption.

Unsere Ergebnisse zeigten ferner, dass C7-Zellen aufgrund einer autokrinen Aktivierungsschleife über ein erhöhtes Basalniveau an phosphoryliertem ERK1/2 verfügen. Die Aktivierungsschleife wird über den EGFR mit nachgeschalteter MAP-Kinasen-Kaskade

Raf-MEK-ERK vermittelt, da sie durch Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase oder von MEK unterbrochen werden kann. Hierdurch lässt sich erklären, dass eine Hemmung von Komponenten der EGFR-Signalkaskade ohne Zugabe von Aldosteron zu einer verstärkten Natriumresorption führt. Diese lässt sich langfristig durch zusätzliche Gabe von Aldosteron verstärken. Insgesamt wird nach unserem Modell in den C7-Zellen eine tonische Hemmung der Natriumresorption durch die autokrine Aktivierung der EGFR-Signalkaskade erzeugt. Bei Stimulation mit Aldosteron kommt es über eine gesteigerte ENaC-Expression zu vermehrter Natriumresorption, die über SGK und eine verminderte Ubiquitinierung vermittelt wird. Gleichzeitig induziert Aldosteron die Expression von funktionell intaktem EGFR und begrenzt damit den Anstieg der Natriumresorption zeitlich über eine vermehrte ERK-Phosphorylierung. Hierdurch lässt sich die kurze Dauer der stimulierten Natriumresorption in unseren Untersuchungen erklären. Durch eine negative Feedbackschleife wird daher in MDCK-Zellen einer überschießenden Natriumresorption entgegengewirkt. Als weiterer die Komplexität erhöhender Faktor wird neuerdings GILZ angesehen. Es wurde gezeigt, dass GILZ über eine Hemmung der ERK-Signalkaskade zur Enthemmung der tonischen ENaC-Inhibition führt und damit zu einem erhöhten Natriumflux (siehe Abb. 60)<sup>(136;391)</sup>.



**Abb. 60**

Modell für die Regulation des ENaC durch verschiedene Signalmoleküle im distalen Tubulus/Sammelrohr der Niere<sup>(137)</sup>.

#### 4.4. Nicht-genomische Effekte

*Aldosteron führt auch zu nicht-genomischen Effekten, die z.T. über den EGFR vermittelt werden.*

Klassischerweise entfalten Steroidhormone ihre Wirkung an nukleären Rezeptoren ausschließlich über genomische Effekte. Diese sind definiert als Effekte, die durch Bindung des aktivierten Rezeptors als Transkriptionsfaktor an DNA zustande kommen und zu einer vermehrten oder verminderten Expression von entsprechenden Genen führen. Da die hierfür erforderliche Transkription und Translation einiger Zeit bedarf, treten solche genomischen Effekte mit einer Latenz von etwa 15-30 min auf und sind durch Inhibitoren der Translation (Cycloheximid) oder Transkription (Actinomycin D) hemmbar. Diese Kriterien, insbesondere die Latenzzeit, treffen nicht auf alle Steroideffekte zu. Daher nimmt man an, dass Steroide neben genomischen Effekten nicht-genotrope Effekte ohne primäre Wirkung auf DNA ausüben können<sup>(46;201;202;392;393)</sup>.

Auch für Aldosteron sind nicht-genotrope Effekte beschrieben worden, deren molekulare Grundlagen noch nicht abschließend untersucht sind. Selbst die Rolle des MR bei diesen Effekten ist noch unklar. Als Alternative zum klassischen zytosolischen MR wird die Existenz eines Membranrezeptors diskutiert, wie er für den Östrogen-, Glucocorticoid- und Progesteronrezeptor nachgewiesen wurde<sup>(211-213;394-397)</sup>. Beim Östrogenmembranrezeptor handelt es sich um den klassischen Östrogenrezeptor nur mit neuer Lokalisation, während für Progesteron ein alternativer Rezeptor identifiziert wurde. In Analogie dazu könnten die nicht-klassischen Aldosteroneffekte durch den klassischen MR oder ein noch nicht identifiziertes Molekül vermittelt werden. Da sich der gängige MR-Antagonist Spironolakton als problematisch für in vivo Untersuchungen erwiesen hat, sind frühere Arbeiten, in denen eine fehlende Spironolaktonwirkung mit einer MR-Unabhängigkeit gleichgesetzt wurde, neu zu überdenken<sup>(160;207;398)</sup>.

Auch die beteiligten Signaltransduktionsmoleküle sind noch relativ wenig untersucht. Es gibt bei Aldosteron allerdings Hinweise für die Beteiligung von PKC, PI3-K und  $Ca^{++}$  (siehe Einleitung). Unter anderem wird auch eine Rolle von MAP-Kinasen eruiert<sup>(360;399-402)</sup>. Da für die verschiedenen MAP-Kinasen wachstumsfördernde (ERK, JNK, P38) und apoptosefördernde Wirkungen (JNK, p38) bekannt sind sowie eine Beteiligung an Entzündungen (JNK, p38), interessierte uns, ob es einen nicht-genotropen Aldosteroneffekt auf diese MAP-Kinasen gibt, wie bereits für andere Steroidrezeptoren beschrieben<sup>(403-405)</sup>.

Solche nicht-genotropen Effekte könnten für die pathologischen Aldosteronwirkungen mitverantwortlich sein.

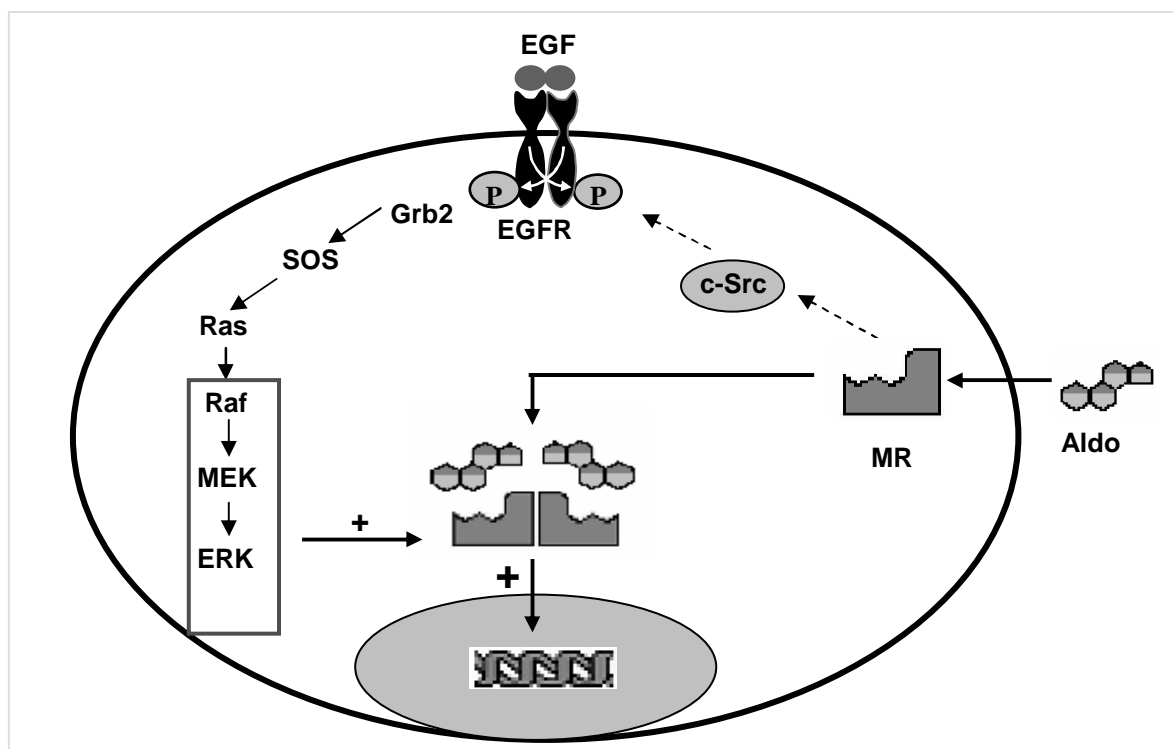
Eine Verstärkung der Wirkungen des profibrotischen und proliferationsinduzierenden Angiotensins durch schnelle Aldostereffekte wird postuliert<sup>(348;368;406)</sup>. Pharmakologische Daten für die Bedeutung von nicht-genotropen Aldosteronwirkungen für NO-Synthese, Gefäßtonus und -reaktivität und Src-Aktivität sind in der Literatur bereits vorhanden<sup>(184;185;221;222;227;407-410)</sup>. Die nicht-genotropen Mechanismen sind ferner von besonderem Interesse, da Interaktionen zwischen genomischen und nicht-genotropen Effekten für verschiedene nukleäre Rezeptoren bereits bekannt sind und z.T. synergistische Wirkungen gefunden wurden<sup>(35;411;412)</sup>.

#### **4.4.1. ERK**

*Aldosteron führt MR- und c-Src-vermittelt zu einer Aktivierung von ERK.*

Unsere Ergebnisse zeigten in CHO-Zellen eine klare Steigerung der ERK-Aktivierung nach 5 min Inkubation mit Aldosteron in MR-exprimierenden Zellen. Aufgrund der Kürze der Zeit ist von einer nicht-genotropen Wirkung auszugehen. Diese Wirkung wird über den MR vermittelt, da Spironolakton zu einer Hemmung des Effektes führte und in unserem heterologen CHO-Expressionssystem nur in Zellen mit transfiziertem hMR eine vermehrte ERK-Phosphorylierung nach Aldosteroninkubation auslösbar war. Die inkomplette Hemmung durch Spironolakton ist eventuell mit einer partial agonistischen Wirkung am MR erklärbar. Unter Berücksichtigung des additiven Effektes von Aldosteron und Spironolakton würde man eine etwa 250%ige Erhöhung der ERK1/2-Aktivierung über das Kontrollniveau erwarten, so dass die inkomplette Hemmung durch Spironolakton durch dessen Eigeneffekt bedingt sein könnte. Ein zweiter MR-Antagonist mit anderer Struktur und besserer Wasserlöslichkeit, RU28318, zeigte ein ähnliches Verhalten. In den MR-transfizierten-Zellen ist auch die ERK-Phosphorylierung als Antwort auf EGF verstärkt im Vergleich zu CHO-Zellen ohne MR. Eine Hochregulierung des EGFR alleine, die z.B. in den CHO-MR-Klonen durch Vorhandensein des MR ausgelöst werden könnte, ist für eine vermehrte ERK-Aktivierung nicht ausreichend, wie die Experimente mit stabil HER1-überexprimierenden CHO-Zellen zeigten. Im Zeitverlauf ist ersichtlich, dass die Aldosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung zwar nicht so ausgeprägt ist wie die EGF bedingte, dass sie aber über den beobachteten Zeitraum von 40 min stabil bleibt, was gut zu einem von uns postulierten chronischen Effekt passt. Auch nach 24 h war die ERK-Phosphorylierung noch auf 210% des Kontrollniveaus.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten einer ERK-Phosphorylierung. Einer der am häufigsten genutzten Signalwege ist EGFR- und Ras-vermittelt<sup>(257)</sup>. Ein weiterer davon unabhängiger Signalweg schließt die PKC ein<sup>(413)</sup>. Durch pharmakologische Untersuchungen mit Inhibitoren wurde deutlich, dass die EGF-vermittelte schnelle ERK-Phosphorylierung über EGFR, Ras und die anschließende MAP-Kinasen-Kaskade Raf, MEK zustande kommt, denn der Mineralocorticoidrezeptor-, PKC- und c-Src-Hemmung hatten keinen Einfluß auf dieses Phänomen. Interessanterweise scheint auch die Aldosteron-vermittelte schnelle ERK-Phosphorylierung über die EGFR-Ras-Raf-MEK-Kaskade zustande zu kommen. Allerdings sind hierbei MR und c-Src mitbeteiligt. Da die funktionellen Daten zeigen, dass die EGF-induzierte ERK-Phosphorylierung, im Gegensatz zur Aldosteron-induzierten, nicht von c-Src abhängig ist, sollte c-Src in der Signalkaskade stromaufwärts des EGFR eine Rolle spielen.



**Abb. 61**

Hypothetischer Mechanismus der schnellen ERK 1/2-Aktivierung durch Aldosteron und sein Einfluss auf die genomischen Effekte.

Eine mögliche Hypothese wäre, dass ligandengebundener hMR c-Src aktiviert, das daraufhin den EGFR phosphoryliert (s. Abb.61). Diese Aktivierung würde dann eine erhöhte Phosphorylierung von ERK nach sich ziehen. Passend dazu sind Untersuchungen am Östrogenrezeptor, die ebenfalls auf eine Interaktion zwischen EGFR und c-Src hinweisen<sup>(414)</sup>. Allerdings ist beim MR noch unklar, ob der MR mit c-Src selbst reagiert oder ob es eine

indirekte Wirkung über weitere Zwischenproteine gibt. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre Pyk2<sup>(415)</sup>. Alternativ könnte auch eine verminderte Aktivität von Tyrosinphosphatasen an einer erhöhten Erk-Phosphorylierung beteiligt sein<sup>(301)</sup>. Dies ist einer der postulierten Interaktionswege zwischen Endothelin-1 und dem EGFR. Eine PKC-Aktivierung, scheint für die Aldosteron-induzierte ERK-Phosphorylierung nicht notwendig zu sein, da der PKC-Inhibitor BIM auf diese keinen Einfluß hatte. Die mit den relativ undifferenzierten CHO- und HEK-Zellen gewonnenen Ergebnisse ließen sich auch in Primärzellen bestätigen, was die allgemeine Bedeutung unterstreicht.

#### **4.4.2. JNK, p38**

*Aldosteron führt MR-vermittelt zu einer Aktivierung von JNK, während es keinen Einfluss auf p38-Phosphorylierung hat.*

Neben einer Beteiligung der MAP-Kinasen ERK 1/2 wurde auch die Aktivierung weiterer krankheitsrelevanter MAP-Kinasen wie JNK und p38 untersucht<sup>(416)</sup>. Für die c-jun NH2-terminal protein kinase JNK zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der Phosphorylierung und damit der Aktivierung bei steigenden Aldosteronkonzentrationen. Dieser Effekt trat nur in Zellen mit transfiziertem MR auf, während er in CHO-Zellen ohne MR nicht nachzuweisen war. Ebenfalls nur durch Zellen mit MR auslösbar war eine JNK-Aktivierung durch EGF. Die Zeitverläufe der Aktivierungen waren in den ersten 40 min praktisch deckungsgleich. Sowohl die EGF- als auch die Aldosteron-induzierte JNK-Aktivierung waren durch den EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor AG1478 hemmbar. Die Aldosteron-induzierte Aktivierung ließ sich durch Spironolakton aufheben, was die Bedeutung des MR nochmals unterstreicht. Der Aldosteroneffekt konnte in abgeschwächter Form auch in Primärzellen aus der Aorta nachgewiesen werden. Da die HAoEC aber bereits in Ruhe eine höhere JNK-Aktivierung aufwiesen und auch auf die Positivkontrolle nur schwach reagierten, lag die geringe Aktivierbarkeit vermutlich an dem ohnehin erhöhten Grundniveau. Im Gegensatz dazu war die p38-Phosphorylierung in Zellen unabhängig von der Anwesenheit des MR und von Aldosteron. Während Aldosteron keine erhöhte Aktivierung bewirkte, lieferte die Positivkontrolle Sorbitol sowohl bei scheintransfizierten CHO-mock- als auch bei CHO-MR-Zellen einen Anstieg auf etwa 250%.

### 4.4.3. Calcium

Aldosteron führt MR-unabhängig zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Auch die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration nach Inkubation mit Aldosteron wurden ermittelt. Es kam unter Aldosteron zu einem leichten Anstieg in HEK-Zellen, wie bereits in verschiedenen Zellarten beschrieben<sup>(202;417;418)</sup>. Da die Fluoreszenz in Anwesenheit von Mangan schwächer war, spricht dies für einen Calciuminflux. Bemerkenswert ist, dass das Calciumsignal nicht vom MR abhängig war, was mit älteren Untersuchungen an Fibroblasten von MR-Knockout-Mäusen und Erythrozyten übereinstimmt<sup>(207;208)</sup>.

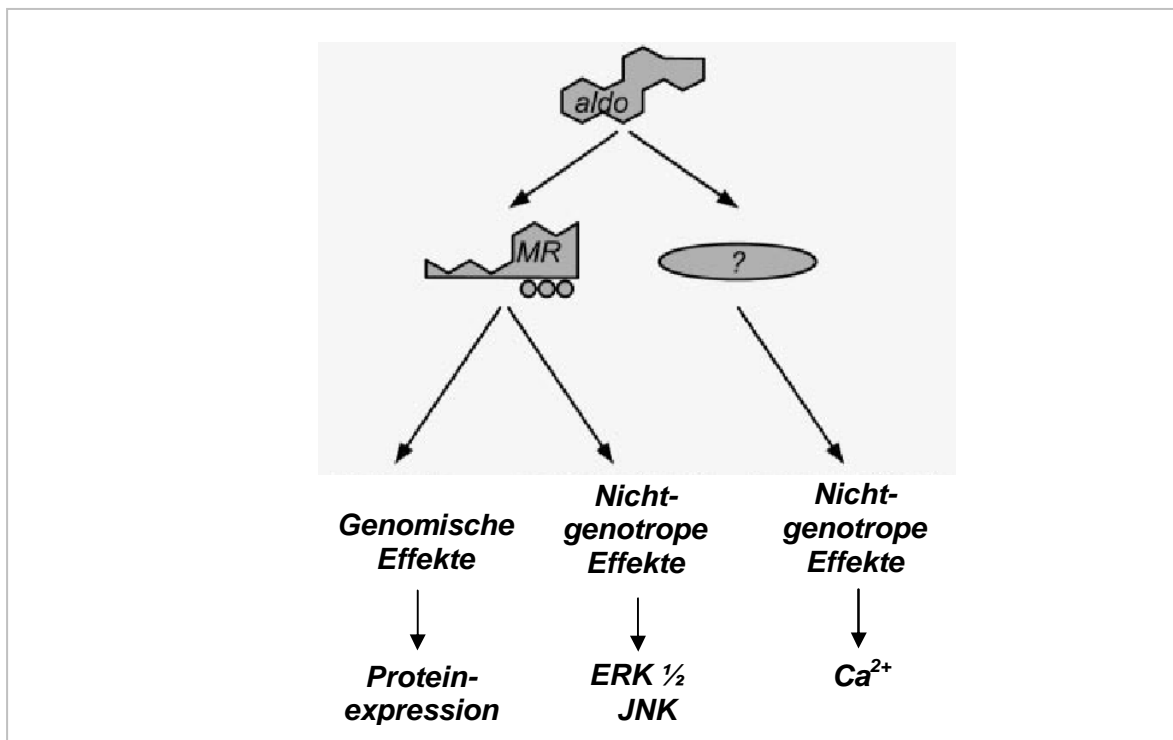


Abb. 62

Mögliche Signalwege für Aldosteron in Zellen.

Folglich sollte bei den Aldosteroneffekten nicht nur zwischen genomischen und nicht-genotropen Effekten unterschieden werden, sondern nach unserem Modell auch zwischen MR-abhängigen nicht-genotropen Effekten und MR-unabhängigen nicht-genotropen Effekten. Hieraus ergibt sich das in Abb. 62 skizzierte Modell für die Wirkung von Aldosteron.

#### 4.5. Interaktion zwischen genomischen und nicht-genotropen Effekten

*Nicht-genotrope Aldosteroneffekte stimulieren genomische durch Beeinflussung der Kerntranslokation des MR.*

In der Literatur gibt es Hinweise dafür, dass schnelle nicht-genotrope Effekte von Steroidrezeptoren die klassischen genomischen Effekte modulieren können<sup>(412;419-422)</sup>. Auch für den MR wurde eine Abschwächung eines genomischen Aldosteroneffektes, nämlich der ki-ras2A-Induktion, durch Hemmung der nicht-genotropen ERK1/2-Aktivierung in VSMC gezeigt<sup>(348)</sup>. Außerdem existieren Daten, dass genomischen MR-Effekte durch Hemmung der MR-vermittelten schnellen PKC $\alpha$ -Aktivierung abgeschwächt werden<sup>(35)</sup>. Allerdings sind die gezeigten Effekte sehr klein und konnten von anderen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden<sup>(36;423)</sup>.

Um den Einfluss der nicht-genotropen Aldosteroneffekte auf die genomischen zu untersuchen, hemmten wir die schnellen Aldosteronwirkungen auf die EGFR-Kaskade durch Inkubation mit dem MEK-Inhibitor UO126 und analysierten dabei die Transaktivierungsaktivität anhand eines GRE-Reporter-Gen-Assays. Es zeigte sich eine Verringerung der GRE-Transaktivierung, die umso ausgeprägter war, je höher die UO126-Konzentration gewählt wurde. Auch für den Glucocorticoidrezeptor ließ sich ein solcher Effekt zeigen, allerdings lag die halbmaximale Hemmung bei etwa fünffach höheren Werten. Es scheint sich folglich um einen allgemeinen Effekt von Corticosteroiden zu handeln, jedoch nicht um ein völlig unspezifisches Phänomen, denn auf die CRE-Aktivierung durch Forskolin hatte UO126 keinen Einfluß. Als mögliche Ursachen für die verringerte Transaktivierung untersuchten wir die Geschwindigkeit des Proteinabbaus und das Ausmaß der Kerntranslokation. Während sich kein gesteigerter Abbau des MR nachweisen ließ, zeigte sich eine Hemmung der Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern. Das Kernshuttling war bei Inkubation mit UO126 stark gehemmt, so dass der Rezeptoranteil im Zytosol und im Kern dem von unstimulierten Zellen entsprach. Der genaue Mechanismus der Translokationsstimulation durch nicht-genotrope Aldosteroneffekte ist noch unklar. Selbst über den nukleären Import des MR an sich gibt es noch nicht viele Untersuchungen. Es wird über insgesamt drei NLS (nuclear localization signals) im MR berichtet, die sich alle in ihrem Aufbau unterscheiden. Aufgrund der Größe des MR wird von einem Importin-vermittelten Mechanismus durch die Kanäle der Kernporenkomplexe ausgegangen. Im Gegensatz zum GR soll der MR-Kern-Transport unidirektional sein<sup>(424-426)</sup>. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die schnelle nicht-genotrope Stimulation des EGFR-Signalweges zu einer Stimulierung der



genomischen Effekte von Aldosteron führt. Da der EGFR langfristig durch Aldosteron induziert wird und es auf diesem Wege ebenfalls zu einer Stimulation der EGFR-Signalkaskade kommt, würden die nicht-genotropen Effekte zusammen mit den genomischen zu einer schnell einsetzenden und lang anhaltenden Stimulation der EGFR-Signalkaskade führen. Eine Hemmung der nicht-genotropen Effekte könnte folglich zu einer Abschwächung der genomischen Aldosteronwirkungen führen, was besonders im Hinblick auf Vermeidung pathophysiologischer Wirkungen von Aldosteron interessant sein könnte. Hierauf weisen Daten zur Serin-/ Threonin-Phosphorylierung des MR durch nicht-genotrope Effekte hin, die die Transaktivierung und den MR-induzierten Natriumtransport beeinflussen<sup>(35)</sup>. Auch für den Progesteronrezeptor wurden vergleichbare Interaktionen gezeigt<sup>(421)</sup>. Weiter Modulationen der genomische Funktion des MR sind an seiner A/B-Domäne durch die zytosolische Calciumkonzentration, ERK1/2-Phosphorylierung und PKA möglich<sup>(423)</sup>. Auch hierdurch bieten sich weitere Angriffspunkte für mögliche therapeutische Interventionen.

#### **4.6. Zukünftige Untersuchungen**

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sprechen sowohl für einen schnellen als auch für einen langsamen Effekt des ligandengebundenen MRs auf den EGFR. Die langfristigen Wirkungen scheinen durch eine Aldosteron/MR-induzierte Expression des EGFR ausgelöst zu werden, was sich sowohl im Tierexperiment als auch in Zellkulturversuchen darstellen ließ. Um die Hypothese, dass es hierdurch zu einer vermehrten pathologischen Aldosteronwirkung mit Entzündung, Fibrose und Hypertrophie kommt, zu belegen, wären weitere Untersuchungen mit EGFR-Hemmung durch dominant-negative Mutanten, siRNA, pharmakologische Inhibitoren, inhibitorische Antikörper oder einen gewebspezifischen Knock-out interessant. Auch eine immunohistochemische Charakterisierung der Zelltypen, die den EGFR nach Aldosteronexposition im kardiovaskulären und renalen System vermehrt exprimieren, könnte Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der Aldosteronwirkung ermöglichen. Da in der Krebstherapie bereits verschiedene Ansätze zur EGFR-Hemmung eingesetzt werden, könnte auf diese Erkenntnisse bei der Therapie der pathologischen Aldosteronwirkungen zurückgegriffen werden. Beispielsweise werden monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR (z.B. Cetuximab) und reversible und irreversible Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase (z.B. Gefitinib das gegen die ATP-Bindungsstelle gerichtet ist) zur Zeit in klinischen Studien getestet und sind in einigen Ländern bereits zugelassen, während sich Antisense-Oligonukleotide und

antikörperbasierende Immunokonjugate wie Immunotoxine, Immunoradionuklide und Immunoliposomen noch in der Testphase befinden.

Um die Spezifität des MR an sich besser zu verstehen und eine Abgrenzung zu GR-Wirkungen zu ermöglichen, wären weitere Untersuchungen zur MR-EGFR-Promotor-Wirkung erstrebenswert. Falls sich eine direkte Interaktion zwischen ligandengebundenem MR und EGFR-Promotor zeigen ließe, würde eine nähere Charakterisierung des mineralocorticoid response elements (MRE) eine Datenbankanalyse nach weiteren MRE-haltigen Promotoren ermöglichen. Durch gezielte Experimente würden sich daraus MR-regulierte Gene ableiten lassen, was zum Verständnis der MR-Wirkung beitragen würde. Falls noch Zwischenmoleküle an der EGFR-Promotor-MR-Interaktion beteiligt wären, könnten sich hieraus Zielstrukturen zur Modulierung von MR-Effekten ergeben.

Für die schnellen MR-induzierten EGFR-Wirkungen wurde aufgrund von bisherigen Daten und Ergebnissen von anderen nukleären Rezeptoren eine Beteiligung von c-Src postuliert. Hier sind weitere Untersuchungen zum Aufklären der genauen Mechanismen erforderlich, beispielsweise durch FRET oder BRET, mit denen eine direkte Interaktion zwischen MR und c-Src darstellbar wäre. Auch der Mechanismus der Interaktion zwischen nicht-genotropen und genomischen Aldosteroneffekten bietet noch Möglichkeiten für weitere Untersuchungen, wobei besonders posttranslationale MR-Modifikationen und die Kerntranslokation relevant wären.

## 5. Summary

Classically, aldosterone-bound MR regulates blood pressure as well as salt and water homeostasis. Recent clinical studies have shown that aldosterone can additionally lead to cardiovascular and renal remodeling; however, the underlying mechanisms are still unclear. The EGFR is a growth factor and heterologous signal transducer for G-protein-coupled receptors of for example angiotensin II, phenylephrine and endothelin-1. There are indications in literature that there is cross-talk between aldosterone/MR and EGFR signaling. For example, mineralocorticoids can lead to both enhanced vascular remodeling and an increase in EGFR-mRNA after cerebral injury and they can also augment EGF-induced vasoconstriction. Therefore, one attractive hypothesis to explain the pathophysiological effects of aldosterone is an aldosterone-induced EGFR expression with consequently increased signaling of vasoactive and profibrotic peptides.

To evaluate this hypothesis, we tested EGFR expression after aldosterone incubation in different model systems. We found an aldosterone-induced EGFR expression in a heterologous expression system of CHO cells, in endogenously MR-expression cell lines as well as in primary culture. This was also true in the kidney, aorta and the heart of adrenalectomized rats equipped with osmotic minipumps. The closely related glucocorticoid receptor did not lead to enhanced EGFR expression, making this phenomenon MR specific.

Because of its possible therapeutical relevance for remodeling processes, the underlying molecular mechanism of the MR/EGFR cross-talk is of special interest. To characterize it we looked at the promoter activity of the EGFR which was enhanced after incubation with aldosterone. Furthermore, we could narrow down the EGFR promoter regions involved in this interaction down to two DNA fragments. Concerning the MR, the n-terminal A/B-domain is necessary to elicit full activation of the promoter while the domains C, D, E and F by themselves are not enough.

To gain evidence for the physiological and pathophysiological relevance of the interaction between the MR and the EGFR, we looked at formation of extracellular matrix and sodium reabsorption in the renal collecting duct. As an indicator for enhanced formation of extracellular matrix and remodeling, we measured fibronectin secretion of human aortal smooth muscle cells. After incubation with aldosterone and especially in the presence of EGF, an increase in fibronectin secretion could be measured that was antagonized by inhibitors of

the EGFR cascade. This supports the hypothesis that the aldosterone-EGFR cross-talk is involved in cardiovascular and renal remodeling processes. Besides this pathophysiological effect, aldosterone-induced EGFR expression in the renal collecting duct can also lead to a reduction in sodium reabsorption. This counteracts the increase in sodium reabsorption classically induced by aldosterone and can therefore function as a negative feedback loop limiting long-term aldosterone-induced sodium reabsorption.

In addition to traditional genomic effects, steroids can also elicit non-genotropic actions. Aldosterone, for example, can lead to MR- and EGFR-mediated activation of ERK1/2 and JNK1/2. The non-genotropic aldosterone-induced ERK activation is also reduced by c-Src-inhibitors and leads to an increase in the cytosolic-nuclear shuttling of the MR. Therefore, the non-genotropic effects can modulate genomic effects via the EGFR pathway. Furthermore, aldosterone can induce a rise in the concentration of cytosolic calcium which is independent on the MR. Consequently, non-genotropic actions are partially mediated by the MR and partially MR-independent.

Overall, there is a cross-talk between aldosterone/MR and EGFR signaling on different levels with evidence for relevance for physiological and pathophysiological processes.

## 6. Zusammenfassung

Klassischerweise ist der Aldosteron-gebundene MR an der Regulation des Blutdruckes und des Wasser-Elektrolyt-Haushaltes beteiligt. Neuere klinische Studien zeigen allerdings, dass Aldosteron auch an pathophysiologischen Remodelingprozessen im kardiovaskulären und renalen System mitwirkt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Der EGFR ist ein Wachstumsfaktor und heterologer Signaltransduktor für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren von beispielsweise Angiotensin II, Phenylephrin und Endothelin-1. In der Literatur gibt es Hinweise für eine Interaktion zwischen den Signaltransduktionswegen von Aldosteron/MR und EGFR. So können Mineralocorticoide nach zerebraler Ischämie zu einem vermehrten vaskulären Remodeling und einem Anstieg der EGFR-mRNA-Konzentration führen und außerdem eine EGF-induzierte Vasokonstriktion verstärken. Daher wäre eine mögliche Erklärung für die pathophysiologische Wirkung von Aldosteron eine Induktion der EGFR-Expression mit vermehrter Wirksamkeit von vasoaktiven Peptiden.

Um diese Hypothese zu überprüfen untersuchten wir in verschiedenen Modellsystemen, ob Aldosteron die EGFR-Proteinexpression erhöht. Dies war sowohl im heterologen CHO-Expressionsystem also auch in MR-exprimierenden Zelllinien und Primärkulturen der Fall. Auch in adrenaletomierten Ratten mit osmotischen Minipumpen bestätigte sich die Aldosteron-induzierte EGFR-Expression in der Aorta, im linken Herzen und der Niere. Über den eng verwandten Glucocorticoidrezeptor ließ sich keine EGFR-Expressionssteigerung auslösen, so dass es sich um einen MR-spezifischen Effekt handelt.

Zur Charakterisierung des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus, der besonders für therapeutische Interventionen von Interesse ist, wurde die Promotoraktivität des EGFR untersucht. Es zeigte sich bei Aldosteroninkubation eine gesteigerte EGFR-Promotoraktivität im Reporter-Gen-Assay. Die beteiligten Promotoranteile konnten mit Deletionskonstrukten auf zwei DNA-Fragmente eingegrenzt werden. Von Seiten des MR ist die A/B-Domäne für die Interaktion bedeutend, denn ein trunkierter MR mit den Domänen C, D, E und F genügt nicht, um den EGFR-Promoter vollständig zu aktivieren.

Um Hinweise für die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Interaktion zwischen MR und EGFR zu erhalten, untersuchten wir sowohl den Einfluß auf die Bildung von Extrazellulärmatrix in glatten Gefäßmuskelzellen als auch auf die Natriumresorption im

Sammelrohr der Niere. Als Anhaltspunkt für die vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix wie sie bei Remodelingprozessen vorkommt, quantifizierten wir die Fibronektinsekretion in glatten Muskelzellen der humanen Aorta (HAoSMC). Nach Aldosteroninkubation und besonders bei Koinkubation mit EGF zeigte sich eine vermehrte Fibronektinsekretion ins Medium, die sich durch Hemmer der EGFR-Kaskade normalisieren ließ. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Aldosteron-EGFR-Interaktion an der Entstehung von Remodelingprozessen im kardiovaskulären und renalen System beteiligt ist. Neben einem Einfluss auf die Entstehung pathophysiologischer Prozesse im kardiovaskulären und renalen System kommt es über eine Aldosteron-induzierte EGFR-Expression im Sammelrohr der Niere auch zu physiologischen Effekten, nämlich einer Hemmung der Natriumresorption. Diese wirkt der klassischerweise durch Aldosteron vermittelten vermehrten Natriumresorption über den epithelialen Natriumkanal (ENaC) entgegen und könnte daher als negative Feedbackschleife Dauer und Ausmaß der Aldosteron-induzierten Natriumresorption limitieren.

Zusätzlich zu den klassischen genomischen Wirkungen zeigen Steroide nicht-genotrope Effekte. Beim Aldosteron führen diese MR- und EGFR-vermittelt zu einer Aktivierung der ERK1/2- und JNK-1/2-Kinasen. Die nicht-genotrope Aldosteron-induzierte ERK-Aktivierung ist ferner durch c-Src-Inhibitoren hemmbar und führt zu einer Stimulation der Kerntranslokation des MR. Nicht-genotrope Effekte können folglich unter Beteiligung der EGFR-Signalkaskade die genomischen modulieren. Aldosteron führt ebenfalls zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, allerdings ist dieser Effekt unabhängig vom MR. Hieraus folgt, dass die nicht-genotropen Effekte teilweise MR-vermittelt und teilweise MR-unabhängig sind.

Insgesamt konnte also auf verschiedenen Ebenen eine Interaktion zwischen Aldosteron/MR und der EGFR-Signalkaskade gezeigt werden, mit Hinweisen für eine Bedeutung bei sowohl physiologischen als auch pathophysiologische Vorgängen.

## 7. Literatur

1. Beato M. Transcriptional regulation of mouse mammary tumor virus by steroid hormones. *Crit Rev Oncog*. 1991;2:195-210.
2. Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 1989;56:335-344.
3. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988;240:889-895.
4. Funder JW, Pearce PT, Smith R et al. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*. 1988;242:583-585.
5. Stewart PM, Whorwood CB, Walker BR. Steroid hormones and hypertension: the cortisol-cortisone shuttle. *Steroids*. 1993;58:614-620.
6. Lim-Tio SS, Keightley MC, Fuller PJ. Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor. *Endocrinology*. 1997;138:2537-2543.
7. Hu X, Funder JW. The evolution of mineralocorticoid receptors. *Mol Endocrinol*. 2005.
8. Bridgham JT, Carroll SM, Thornton JW. Evolution of hormone-receptor complexity by molecular exploitation. *Science*. 2006;312:97-101.
9. Morrison N, Harrap SB, Arriza JL et al. Regional chromosomal assignment of the human mineralocorticoid receptor gene to 4q31.1. *Hum Genet*. 1990;85:130-132.
10. Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y et al. Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms. *J Biol Chem*. 1995;270:21016-21020.
11. 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;10:1549-1560.
12. Le Menuet D, Viengchareun S, Penfornis P et al. Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2000;275:7878-7886.
13. Zennaro MC, Souque A, Viengchareun S et al. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1586-1598.
14. Bloem LJ, Guo C, Pratt JH. Identification of a splice variant of the rat and human mineralocorticoid receptor genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;55:159-162.

15. Walther RF, Atlas E, Carrigan A 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;280:17549-17561.
16. 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;14:889-899.
17. Pascual-Le Tallec L, Kirsh O, Lecomte MC 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. *Molecular Endocrinology.* 2003;17:2529-2542.
18. Pascual-Le Tallec L, Lombes M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol.* 2005;19:2211-2221.
19. Liu W, Wang J, Sauter NK et al. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:12480-12484.
20. Black BE, Holaska JM, Rastinejad F et al. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol.* 2001;11:1749-1758.
21. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:451-486.
22. Williams SP, Sigler PB. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature.* 1998;393:392-396.
23. Sack JS, Kish KF, Wang C et al. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:4904-4909.
24. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell.* 2002;110:93-105.
25. Kauppi B, Jakob C, Farnegardh M et al. The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem.* 2003;278:22748-22754.
26. Couette B, Jalaguier S, Hellal-Levy C et al. Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Mol Endocrinol.* 1998;12:855-863.
27. Fagart J, Huyet J, Pinon GM et al. Crystal structure of a mutant mineralocorticoid receptor responsible for hypertension. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:554-555.
28. Auzou G, Fagart J, Souque A et al. A single amino acid mutation of ala-773 in the mineralocorticoid receptor confers agonist properties to 11beta-substituted spiro lactones. *Mol Pharmacol.* 2000;58:684-691.



29. Binart N, Lombes M, Rafestin-Oblin ME et al. Characterization of human mineralocorticosteroid receptor expressed in the baculovirus system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10681-10685.
30. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 1997;18:306-360.
31. Lombes M, Binart N, Delahaye F et al. Differential intracellular localization of human mineralocorticosteroid receptor on binding of agonists and antagonists. *Biochem J*. 1994;302 ( Pt 1):191-197.
32. Fejes-Toth G, Pearce D, Naray-Fejes-Toth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:2973-2978.
33. Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C et al. Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol*. 2001;21:781-793.
34. Pascual-Le Tallec L, Demange C, Lombes M. Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *Eur J Endocrinol*. 2004;150:585-590.
35. Le Moellic C, Ouvrard-Pascaud A, Capurro C et al. Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC $\alpha$  activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1145-1160.
36. Lim-Tio SS, Fuller PJ. Intracellular Signaling Pathways Confer Specificity of Transactivation by Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors. *Endocrinology*. 1998;139:1653-1661.
37. Massaad C, Houard N, Lombes M et al. Modulation of human mineralocorticoid receptor function by protein kinase A. *Mol Endocrinol*. 1999;13:57-65.
38. Marissal-Arvy N, Lombes M, Petterson J et al. Gain of function mutation in the mineralocorticoid receptor of the Brown Norway rat. *J Biol Chem*. 2004;279:39232-39239.
39. Marissal-Arvy N, Mormede P. Excretion of electrolytes in Brown Norway and Fischer 344 rats: effects of adrenalectomy and of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Exp Physiol*. 2004;89:753-765.
40. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. 1999;20:321-344.
41. Meijer OC, Kalkhoven E, van der Laan S et al. Steroid Receptor Coactivator-1 Splice Variants Differentially Affect Corticosteroid Receptor Signaling. *Endocrinology*. 2005;146:1438-1448.
42. Zhou K, Choe KT, Zaidi Z et al. RNA helicase A interacts with dsDNA and topoisomerase II $\alpha$ . *Nucleic Acids Res*. 2003;31:2253-2260.

43. Kitagawa H, Yanagisawa J, Fuse H et al. Ligand-selective potentiation of rat mineralocorticoid receptor activation function 1 by a CBP-containing histone acetyltransferase complex. *Mol Cell Biol.* 2002;22:3698-3706.
44. Obradovic D, Tirard M, Nemethy Z et al. 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;65:761-769.
45. Pascual-Le Tallec L, Simone F, Viengchareun S et al. The elongation factor ELL (eleven-nineteen lysine-rich leukemia) is a selective coregulator for steroid receptor functions. *Mol Endocrinol.* 2005;19:1158-1169.
46. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* 1987;237:268-275.
47. Edwards CR, Stewart PM, Burt D et al. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet.* 1988;2:986-989.
48. Monder C, Shackleton CH, Bradlow HL et al. The syndrome of apparent mineralocorticoid excess: its association with 11 beta-dehydrogenase and 5 beta-reductase deficiency and some consequences for corticosteroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63:550-557.
49. Stewart PM, Corrie JE, Shackleton CH et al. Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle. *J Clin Invest.* 1988;82:340-349.
50. Funder JW. Is aldosterone bad for the heart? *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2004;15:139-142.
51. Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2519-2525.
52. Lombes M, Alfaidy N, Eugene E et al. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation.* 1995;92:175-182.
53. Slight SH, Ganjam VK, Gomez-Sanchez CE et al. High affinity NAD(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:781-787.
54. Sheppard KE, Autelitano DJ. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 transforms 11-dehydrocorticosterone into transcriptionally active glucocorticoid in neonatal rat heart. *Endocrinology.* 2002;143:198-204.
55. Diaz R, Brown RW, Seckl JR. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J Neurosci.* 1998;18:2570-2580.

56. Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A et al. Mechanistic aspects of mineralocorticoid receptor activation. *Kidney Int.* 2000;57:1250-1255.
57. Rogerson FM, Fuller PJ. Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;200:45-55.
58. Davies E, MacKenzie SM. Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30:437-445.
59. Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T et al. Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994;269:24316-24320.
60. Takeda Y. Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;217:75-79.
61. Hatakeyama H, Miyamori I, Takeda Y et al. The expression of steroidogenic enzyme genes in human vascular cells. *Biochem Mol Biol Int.* 1996;40:639-645.
62. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T et al. Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:2797-2800.
63. Wu P, Guo Z, Zhang Y et al. Aldosterone overproduction and CYP11B2 mRNA overexpression in vessels of spontaneously hypertensive rats. *Horm Res.* 1998;50:28-31.
64. Silvestre JS, Robert V, Heymes C et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem.* 1998;273:4883-4891.
65. Young MJ, Clyne CD, Cole TJ et al. Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5121-5126.
66. Satoh M, Nakamura M, Saitoh H et al. Aldosterone synthase (CYP11B2) expression and myocardial fibrosis in the failing human heart. *Clin Sci (Lond).* 2002;102:381-386.
67. Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG et al. Origin of aldosterone in the rat heart. *Endocrinology.* 2004;145:4796-4802.
68. Fiebeler A, Nussberger J, Shagdarsuren E et al. Aldosterone Synthase Inhibitor Ameliorates Angiotensin II-Induced Organ Damage. *Circulation.* 2005;111:3087-3094.
69. Rocha R, Funder JW. The pathophysiology of aldosterone in the cardiovascular system. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;970:89-100.
70. Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM et al. The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct.* 1997;7:85-98.
71. Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 1993;268:21455-21458.

72. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83:835-839.
73. Lombes M, Binart N, Oblin ME et al. Characterization of the interaction of the human mineralocorticosteroid receptor with hormone response elements. *Biochem J*. 1993;292 ( Pt 2):577-583.
74. Trapp T, Holsboer F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci*. 1996;17:145-149.
75. Krozowski ZS, Rundle SE, Wallace C et al. Immunolocalization of renal mineralocorticoid receptors with an antiserum against a peptide deduced from the complementary deoxyribonucleic acid sequence. *Endocrinology*. 1989;125:192-198.
76. Fukushima K, Sasano H, Nagura H et al. Immunohistochemical localization of mineralocorticoid receptor in human gut. *Tohoku J Exp Med*. 1991;165:155-163.
77. Sheppard K, Funder JW. Type I receptors in parotid, colon, and pituitary are aldosterone selective in vivo. *Am J Physiol*. 1987;253:E467-E471.
78. 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:F76-F80.
79. Krozowski Z, Funder JW. Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology*. 1981;109:1811-1813.
80. Agarwal MK, Mirshahi M. Rat lung possesses the mineralocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;183:405-410.
81. Sasano H, Fukushima K, Sasaki I et al. Immunolocalization of mineralocorticoid receptor in human kidney, pancreas, salivary, mammary and sweat glands: a light and electron microscopic immunohistochemical study. *J Endocrinol*. 1992;132:305-310.
82. Fuller PJ, Verity K. Mineralocorticoid receptor gene expression in the gastrointestinal tract: distribution and ontogeny. *J Steroid Biochem*. 1990;36:263-267.
83. Verrey F, Pearce D, Pfeiffer R et al. Pleiotropic action of aldosterone in epithelia mediated by transcription and post-transcription mechanisms. *Kidney Int*. 2000;57:1277-1282.
84. Verrey F. Sodium reabsorption in aldosterone-sensitive distal nephron: news and contributions from genetically engineered animals. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10:39-47.
85. Stockand JD. New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F559-F576.
86. Kemendy AE, Kleyman TR, Eaton DC. Aldosterone alters the open probability of amiloride-blockable sodium channels in A6 epithelia. *AJP - Cell Physiology*. 1992;263:C825-C837.

87. Helman SI, Liu X, Baldwin K et al. Time-dependent stimulation by aldosterone of blocker-sensitive ENaCs in A6 epithelia. *AJP - Cell Physiology*. 1998;274:C947-C957.
88. Cho JH, Musch MW, Bookstein CM et al. Aldosterone stimulate intestinal Na<sup>+</sup> absorption in rats by increasing NHE3 expression of the proximal colon. *Am J Physiol*. 1998;274:C586-C594.
89. Krug AW, Papavassiliou F, Hopfer U et al. Aldosterone stimulates surface expression of NHE3 in renal proximal brush borders. *Pflugers Arch*. 2003;446:492-496.
90. Turban S, Wang XY, Knepper MA. Regulation of NHE3, NKCC2, and NCC abundance in kidney during aldosterone escape phenomenon: role of NO. *AJP - Renal Physiology*. 2003;285:F843-F851.
91. Drumm K, Kress TR, Gassner B et al. Aldosterone stimulates activity and surface expression of NHE3 in human primary proximal tubule epithelial cells (RPTEC). *Cell Physiol Biochem*. 2006;17:21-28.
92. Kim GH, Masilamani S, Turner R et al. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14552-14557.
93. Booth RE, Johnson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Educ*. 2002;26:8-20.
94. Asher C, Wald H, Rossier BC et al. Aldosterone-induced increase in the abundance of Na<sup>+</sup> channel subunits. *Am J Physiol*. 1996;271:C605-C611.
95. Escoubet B, Coureau C, Bonvalet JP et al. Noncoordinate regulation of epithelial Na channel and Na pump subunit mRNAs in kidney and colon by aldosterone. *AJP - Cell Physiology*. 1997;272:C1482-C1491.
96. Masilamani S, Kim GH, Mitchell C et al. Aldosterone-mediated regulation of ENaC {alpha}, {beta}, and {gamma} subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest*. 1999;104:R19-R23.
97. Shimkets RA, Warnock DG, Bositis CM et al. Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell*. 1994;79:407-414.
98. Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet*. 1995;11:76-82.
99. Grunder S, Firsov D, Chang SS et al. A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel. *EMBO J*. 1997;16:899-907.
100. Rossier BC, Pradervand S, Schild L et al. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: Interaction Between Genetic and Environmental Factors. *Annual Review of Physiology*. 2002;64:877-897.

101. Flores SY, Debonneville C, Staub O. The role of Nedd4/Nedd4-like dependant ubiquitylation in epithelial transport processes. *Pfl+ + gers Archiv European Journal of Physiology*. 2003;446:334-338.
102. Debonneville C, Flores SY, Kamynina E et al. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J*. 2001;20:7052-7059.
103. Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K et al. The Serum- and Glucocorticoid-Induced Kinase Is a Physiological Mediator of Aldosterone Action. *Endocrinology*. 2001;142:1587-1594.
104. Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M et al. Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest*. 2002;109:401-408.
105. Thomas CP, Itani OA. New insights into epithelial sodium channel function in the kidney: site of action, regulation by ubiquitin ligases, serum- and glucocorticoid-inducible kinase and proteolysis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13:541-548.
106. Edinger RS, Yospin J, Perry C et al. Regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channels (ENaC) by methylation: a novel methyltransferase stimulates ENaC activity. *J Biol Chem*. 2006;281:9110-9117.
107. Snyder PM. Minireview: regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. *Endocrinology*. 2005;146:5079-5085.
108. Attali B, Latter H, Rachamim N et al. A corticosteroid-induced gene expressing an "IsK-like" K<sup>+</sup> channel activity in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6092-6096.
109. Shi H, Levy-Holzman R, Cluzeaud F et al. Membrane topology and immunolocalization of CHIF in kidney and intestine. *AJP - Renal Physiology*. 2001;280:F505-F512.
110. Brennan FE, Fuller PJ. Acute Regulation by Corticosteroids of Channel-Inducing Factor Gene Messenger Ribonucleic Acid in the Distal Colon. *Endocrinology*. 1999;140:1213-1218.
111. Aizman R, Asher C, Fuzesi M et al. Generation and phenotypic analysis of CHIF knockout mice. *AJP - Renal Physiology*. 2002;283:F569-F577.
112. Beguin P, Crambert G, Guennoun S et al. CHIF, a member of the FXYD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J*. 2001;20:3993-4002.
113. Pearce D. The role of SGK1 in hormone-regulated sodium transport. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:341-347.
114. Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G. The sgk, an aldosterone-induced gene in mineralocorticoid target cells, regulates the epithelial sodium channel. *Kidney Int*. 2000;57:1290-1294.

115. Wulff P, Vallon V, Huang DY et al. Impaired renal Na<sup>+</sup> retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest.* 2002;110:1263-1268.
116. Huang DY, Wulff P, Volk H et al. Impaired Regulation of Renal K<sup>+</sup> Elimination in the sgk1-Knockout Mouse. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2004;15:885-891.
117. Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease. *Physiol Rev.* 2002;82:245-289.
118. Snyder PM, Olson DR, Thomas BC. Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase Modulates Nedd4-2-mediated Inhibition of the Epithelial Na<sup>+</sup> Channel. *J Biol Chem.* 2002;277:5-8.
119. Flores SY, Loffing-Cueni D, Kamynina E et al. Aldosterone-induced serum and glucocorticoid-induced kinase 1 expression is accompanied by Nedd4-2 phosphorylation and increased Na<sup>+</sup> transport in cortical collecting duct cells. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2279-2287.
120. Alvarez de la Rosa D, Gimenez I, Forbush B et al. SGK1 activates Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in amphibian renal epithelial cells. *AJP - Cell Physiology.* 2006;290:C492-C498.
121. Zecevic M, Heitzmann D, Camargo S et al. SGK1 increases Na,K-ATP cell-surface expression and function in *Xenopus laevis* oocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 2004;448:29-35.
122. Setiawan\* I, Henke\* G, Feng Y et al. Stimulation of *Xenopus* oocyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase by the serum and glucocorticoid-dependent kinase sgk1. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology.* 2002;444:426-431.
123. Fillon S, Warntges S, Matskevitch J et al. Serum- and glucocorticoid-dependent kinase, cell volume, and the regulation of epithelial transport. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 2001;130:367-376.
124. Lang F, Klingel K, Wagner CA et al. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97:8157-8162.
125. Warntges S, Grone H-J, Capasso G et al. Cell Volume Regulatory Mechanism in Progression of Renal Disease. *J Nephrol.* 2001;319-326.
126. Yoo D, Kim BY, Campo C et al. Cell Surface Expression of the ROMK (Kir 1.1) Channel Is Regulated by the Aldosterone-induced Kinase, SGK-1, and Protein Kinase A. *J Biol Chem.* 2003;278:23066-23075.
127. Yun CC, Palmada M, Embark HM et al. The Serum and Glucocorticoid-Inducible Kinase SGK1 and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Regulating Factor NHERF2 Synergize to Stimulate the Renal Outer Medullary K<sup>+</sup> Channel ROMK1. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2002;13:2823-2830.

128. Spindler B, Mastroberardino L, Custer M et al. Characterization of early aldosterone-induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1997;434:323-331.
129. Brennan FE, Fuller PJ. Mammalian K-ras2 Is a Corticosteroid-Induced Gene in Vivo. *Endocrinology*. 2006;147:2809-2816.
130. Mastroberardino L, Spindler B, Forster I et al. Ras Pathway Activates Epithelial Na<sup>+</sup> Channel and Decreases Its Surface Expression in *Xenopus* Oocytes. *Mol Biol Cell*. 1998;9:3417-3427.
131. Stockand JD, Spier BJ, Worrell RT et al. Regulation of Na<sup>+</sup> Reabsorption by the Aldosterone-induced Small G Protein K-Ras2A. *J Biol Chem*. 1999;274:35449-35454.
132. Staruschenko A, Patel P, Tong Q et al. Ras Activates the Epithelial Na<sup>+</sup> Channel through Phosphoinositide 3-OH Kinase Signaling. *J Biol Chem*. 2004;279:37771-37778.
133. Staruschenko A, Pochynyuk OM, Tong Q et al. Ras couples phosphoinositide 3-OH kinase to the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2005;1669:108-115.
134. Ayroldi E, Zollo O, Macchiarulo A et al. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Inhibits the Raf-Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Binding to Raf-1. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7929-7941.
135. Robert-Nicoud M, Flahaut M, Elalouf J-M et al. Transcriptome of a mouse kidney cortical collecting duct cell line: Effects of aldosterone and vasopressin. *PNAS*. 2001;98:2712-2716.
136. Soundararajan R, Zhang TT, Wang J et al. A Novel Role for Glucocorticoid-induced Leucine Zipper Protein in Epithelial Sodium Channel-mediated Sodium Transport. *J Biol Chem*. 2005;280:39970-39981.
137. Bhalla V, Soundararajan R, Pao AC et al. Disinhibitory Pathways for Control of Sodium Transport: Regulation of ENaC by SGK1 and GILZ. *AJP - Renal Physiology*. 2006;00061.
138. Hu XL, Liu XP, Deng YC et al. Expression analysis of the NDRG2 gene in mouse embryonic and adult tissues. *Cell and Tissue Research*. 2006;1-10.
139. Boulkroun S, Fay M, Zennaro MC et al. Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene. *J Biol Chem*. 2002;277:31506-31515.
140. Murray JT, Campbell DG, Morrice N et al. Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem J*. 2004;384:477-488.
141. Burchfield JG, Lennard AJ, Narasimhan S et al. Akt Mediates Insulin-stimulated Phosphorylation of Ndr2: Evidence for cross-talk with protein kinase C {theta}. *J Biol Chem*. 2004;279:18623-18632.



142. Boulkroun S, Le Moellic C, Blot-Chabaud M et al. Expression of androgen receptor and androgen regulation of NDRG2 in the rat renal collecting duct. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 2005;451:388-394.
143. Pfeiffer R, Beron J, Verrey F. Regulation of Na<sup>+</sup> pump function by aldosterone is alpha-subunit isoform specific. *J Physiol (Lond)*. 1999;516:647-655.
144. Feraille E, Mordasini D, Gonin S 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.
145. Verrey F, Beron J, Spindler B. Corticosteroid regulation of renal Na,K-ATPase. *Miner Electrolyte Metab*. 1996;22:279-292.
146. Verrey F. Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport. *Am J Physiol*. 1999;277:F319-F327.
147. Beron J, Mastroberardino L, Spillmann A et al. Aldosterone modulates sodium kinetics of Na,K-ATPase containing an alpha 1 subunit in A6 kidney cell epithelia. *Mol Biol Cell*. 1995;6:261-271.
148. Kolla V, Litwack G. Transcriptional regulation of the human NA/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Biochem*. 2000;204:35-40.
149. Blot-Chabaud M, Djelidi S, Courtois-Coutry N et al. Coordinate control of Na,K-ATPase mRNA expression by aldosterone, vasopressin and cell sodium delivery in the cortical collecting duct. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*. 2001;47:247-253.
150. Blazer-Yost BL, Liu X, Helman SI. Hormonal regulation of ENaCs: insulin and aldosterone. *AJP - Cell Physiology*. 1998;274:C1373-C1379.
151. Edinger RS, Rokaw MD, Johnson JP. Vasopressin stimulates sodium transport in A6 cells via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *AJP - Renal Physiology*. 1999;277:F575-F579.
152. Connell JMC, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. 2005;186:1-20.
153. Mick VE, Itani OA, Loftus RW et al. The  $\alpha$ -Subunit of the Epithelial Sodium Channel Is an Aldosterone-Induced Transcript in Mammalian Collecting Ducts, and This Transcriptional Response Is Mediated via Distinct cis-Elements in the 5'-Flanking Region of the Gene. *Molecular Endocrinology*. 2001;15:575-588.
154. Maiyar AC, Phu PT, Huang AJ et al. Repression of Glucocorticoid Receptor Transactivation and DNA Binding of a Glucocorticoid Response Element within the Serum/Glucocorticoid-Inducible Protein Kinase (sgk) Gene Promoter by the p53 Tumor Suppressor Protein. *Molecular Endocrinology*. 1997;11:312-329.
155. Itani OA, Liu KZ, Cornish KL et al. Glucocorticoids stimulate human sgk1 gene expression by activation of a GRE in its 5'-flanking region. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283:E971-E979.

156. Webster MK, Goya L, Ge Y et al. Characterization of sgk, a Novel Member of the Serine/Threonine Protein Kinase Gene Family Which Is Transcriptionally Induced by Glucocorticoids and Serum. *Mol Cell Biol.* 1993;13:2031-2040.
157. Hao H, Rhodes R, Ingbar DH et al. Dexamethasone responsive element in the rat Na, K-ATPase [beta]1 gene coding region. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression.* 2003;1630:55-63.
158. Kolla V, Robertson NM, Litwack G. Identification of a Mineralocorticoid/Glucocorticoid Response Element in the Human Na/K ATPase [alpha]1 Gene Promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1999;266:5-14.
159. Mazancova K, Kopecky M, Miksik I et al. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the heart of normotensive and hypertensive rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;94:273-277.
160. Alzamora R, Michea L, Marusic ET. Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries. *Hypertension.* 2000;35:1099-1104.
161. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med.* 1992;120:893-901.
162. Funder JW. Steroids, hypertension and cardiac fibrosis. *Blood Press Suppl.* 1995;2:39-42.
163. Rocha R, Stier CT. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:308-314.
164. Rossi GP, Sacchetto A, Pavan E et al. Remodeling of the left ventricle in primary aldosteronism due to Conn's adenoma. *Circulation.* 1997;95:1471-1478.
165. Tanabe A, Naruse M, Naruse K et al. Left ventricular hypertrophy is more prominent in patients with primary aldosteronism than in patients with other types of secondary hypertension. *Hypertens Res.* 1997;20:85-90.
166. Milliez P, Girerd X, Plouin PF et al. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1243-1248.
167. Pitt B, Zannad F, Remme WJ 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;341:709-717.
168. Pitt B, Remme W, Zannad F et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003;348:1309-1321.
169. Young M, Funder JW. Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology.* 2004;145:3153-3157.
170. Young MJ, Moussa L, Dilley R et al. Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology.* 2003;144:1121-1125.

171. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL et al. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension*. 1994;24:30-36.
172. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L et al. Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1994;26:809-820.
173. Fullerton MJ, Funder JW. Aldosterone and cardiac fibrosis: in vitro studies. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1863-1867.
174. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1802-H1810.
175. Sun Y, Zhang J, Lu L et al. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart - role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2002;161:1773-1781.
176. Rocha R, Stier CT, Kifor I et al. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology*. 2000;141:3871-3878.
177. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P et al. Selective Aldosterone Blockade Prevents Angiotensin II/Salt-Induced Vascular Inflammation in the Rat Heart. *Endocrinology*. 2002;143:4828-4836.
178. Qin W, Rudolph AE, Bond BR et al. Transgenic Model of Aldosterone-Driven Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Circ Res*. 2003;93:69-76.
179. Le Menuet D, Viengchareun S, Muffat-Joly M et al. Expression and function of the human mineralocorticoid receptor: lessons from transgenic mouse models. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;217:127-136.
180. Beggah AT, Escoubet B, Puttini S et al. Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* JID - 7505876. 2002;99:7160-7165.
181. Berger S, Bleich M, Schmid W et al. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na<sup>+</sup> metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:9424-9429.
182. Viridis A, Neves MF, Amiri F et al. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;40:504-510.
183. Rajagopalan S, Duquaine D, King S et al. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:2212-2216.
184. Liu SL, Schmuck S, Chorazczyewski JZ et al. Aldosterone Regulates Vascular Reactivity: Short-Term Effects Mediated by Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Nitric Oxide Synthase Activation. *Circulation*. 2003;108:2400-2406.
185. Arima S, Kohagura K, Xu HL et al. Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole. *Hypertension*. 2004;43:352-357.

186. Berger S, Wolfer DP, Selbach O et al. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:195-200.
187. Gomez-Sanchez EP. Intracerebroventricular infusion of aldosterone induces hypertension in rats. *Endocrinology*. 1986;118:819-823.
188. Cooney AS, Fitzsimons JT. Increased sodium appetite and thirst in rat induced by the ingredients of liquorice, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid. *Regul Pept*. 1996;66:127-133.
189. Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V et al. The Role of Mineralocorticoid Receptors in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Regulation in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:3339-3345.
190. Ueda K, Okamura N, Hirai M et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem*. 1992;267:24248-24252.
191. Karssen AM, Meijer OC, van dS, I et al. Multidrug resistance P-glycoprotein hampers the access of cortisol but not of corticosterone to mouse and human brain. *Endocrinology*. 2001;142:2686-2694.
192. Agarwal MK, Mirshahi F, Mirshahi M et al. Immunochemical detection of the mineralocorticoid receptor in rat brain. *Neuroendocrinology*. 1993;58:575-580.
193. Seckl JR. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol*. 1997;18:49-99.
194. Robson AC, Leckie CM, Seckl JR et al. 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998;61:1-10.
195. Ajilore OA, Sapolsky RM. In vivo characterization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat hippocampus using glucocorticoid neuroendangerment as an endpoint. *Neuroendocrinology*. 1999;69:138-144.
196. Kageyama Y, Bravo EL. Hypertensive mechanisms associated with centrally administered aldosterone in dogs. *Hypertension*. 1988;11:750-753.
197. Peysner K, Henry CA, Malvin RL. Central infusion of aldosterone increases blood pressure by mechanisms independent of Na retention. *Clin Exp Hypertens A*. 1990;12:399-414.
198. Gomez-Sanchez EP, Venkataraman MT, Thwaites D et al. ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension. *Am J Physiol*. 1990;258:E649-E653.
199. Gomez-Sanchez EP, Fort CM, Gomez-Sanchez CE. Intracerebroventricular infusion of RU28318 blocks aldosterone-salt hypertension. *Am J Physiol*. 1990;258:E482-E484.
200. Young M, Head G, Funder J. Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am J Physiol*. 1995;269:E657-E662.

201. 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;271:8763-8767.
202. Gekle M, Golenhofen N, Oberleithner H et al. Rapid activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca<sup>2+</sup> and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:10500-10504.
203. Moura AM, Worcel M. Direct action of aldosterone on transmembrane 22Na efflux from arterial smooth muscle. Rapid and delayed effects. *Hypertension*. 1984;6:425-430.
204. Wehling M, Käsmayr J, Theisen K. Fast effects of aldosterone on electrolytes in human lymphocytes are mediated by the sodium-proton-exchanger of the cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164:961-967.
205. Kousteni S, Chen JR, Bellido T et al. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science*. 2002;298:843-846.
206. Michea L, Delpiano AM, Hitschfeld C et al. Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, intracellular Ca<sup>2+</sup> levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology*. 2005;146:973-980.
207. Haseroth K, Gerdes D, Berger S et al. Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;266:257-261.
208. Spach C, Streeten DH. Retardation of sodium exchange in dog erythrocytes by physiological concentrations of aldosterone, in vitro. *J Clin Invest*. 1964;43:217-227.
209. Boldyreff B, Wehling M. Rapid aldosterone actions: from the membrane to signaling cascades to gene transcription and physiological effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003;85:375-381.
210. Christ M, Sippel K, Eisen C et al. Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidneys. *Mol Cell Endocrinol*. 1994;99:R31-R34.
211. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *AJP - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2004;286:R233-R249.
212. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC et al. Cell-Surface Estrogen Receptors Mediate Calcium-Dependent Nitric Oxide Release in Human Endothelia. *Circulation*. 2000;101:1594-1597.
213. Zhu Y, Rice CD, Pang Y et al. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2231-2236.
214. Christ M, Douwes K, Eisen C et al. Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1995;25:117-123.
215. Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M et al. 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;204:475-481.
216. Wehling M, Neylon CB, Fullerton M et al. Nongenomic effects of aldosterone on intracellular  $Ca^{2+}$  in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995;76:973-979.
  217. Christ M, Meyer C, Sippel K et al. Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C  $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213:123-129.
  218. Ebata S, Muto S, Okada K et al. Aldosterone activates  $Na^+/H^+$  exchange in vascular smooth muscle cells by nongenomic and genomic mechanisms. *Kidney Int.* 1999;56:1400-1412.
  219. Maguire D, MacNamara B, Cuffe JE et al. Rapid responses to aldosterone in human distal colon. *Steroids.* 1999;64:51-63.
  220. Doolan CM, O'Sullivan GC, Harvey BJ. Rapid effects of corticosteroids on cytosolic protein kinase C and intracellular calcium concentration in human distal colon. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;138:71-79.
  221. Romagni P, Rossi F, Guerrini L et al. Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis.* 2003;166:345-349.
  222. Schmidt BMW, Oehmer S, Delles C et al. Rapid Nongenomic Effects of Aldosterone on Human Forearm Vasculature. *Hypertension.* 2003;42:156-160.
  223. Schmidt BM, Horisberger K, Feuring M et al. Aldosterone blunts human baroreflex sensitivity by a nongenomic mechanism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005;113:252-256.
  224. Schmidt BMW, Montealegre A, Janson CP et al. Short term cardiovascular effects of aldosterone in healthy male volunteers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3528-3533.
  225. Wehling M, Spes CH, Win N et al. Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3517-3522.
  226. Arima S, Kohagura K, Xu HL et al. Nongenomic vascular action of aldosterone in the glomerular microcirculation. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2255-2263.
  227. Schmidt BM, Sammer U, Fleischmann I et al. Rapid nongenomic effects of aldosterone on the renal vasculature in humans. *Hypertension.* 2006;47:650-655.
  228. Kim HH, Vijapurkar U, Hellyer NJ et al. Signal transduction by epidermal growth factor and heregulin via the kinase-deficient ErbB3 protein. *Biochem J.* 1998;334 ( Pt 1):189-195.
  229. Guy PM, Platko JV, Cantley LC et al. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:8132-8136.
  230. Horan T, Wen J, Arakawa T et al. Binding of Neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *J Biol Chem.* 1995;270:24604-24608.

231. Shilo BZ. Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development*. 2005;132:4017-4027.
232. Chang C, Sternberg PW. C. elegans vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling. *Cancer Metastasis Rev*. 1999;18:203-213.
233. Dominguez M, Wasserman JD, Freeman M. Multiple functions of the EGF receptor in Drosophila eye development. *Curr Biol*. 1998;8:1039-1048.
234. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science*. 1995;269:230-234.
235. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995;376:337-341.
236. Hansen LA, Alexander N, Hogan ME et al. Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *Am J Pathol*. 1997;150:1959-1975.
237. Hom YK, Young P, Wiesen JF et al. Uterine and vaginal organ growth requires epidermal growth factor receptor signaling from stroma. *Endocrinology*. 1998;139:913-921.
238. Sibilio M, Steinbach JP, Stingl L et al. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *Embo J*. 1998;17:719-731.
239. Walker RA, Dearing SJ. Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 1999;53:167-176.
240. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19:183-232.
241. Rubin GJ, Melhem MF, Barnes EL et al. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1996;78:1284-1292.
242. Bartlett JM, Langdon SP, Simpson BJ et al. The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *Br J Cancer*. 1996;73:301-306.
243. Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H et al. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res*. 1997;17:613-619.
244. Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S et al. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res*. 1998;4:241-249.
245. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E et al. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable

- non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res.* 1997;3:515-522.
246. Messa C, Russo F, Caruso MG et al. EGF, TGF-alpha, and EGF-R in human colorectal adenocarcinoma. *Acta Oncol.* 1998;37:285-289.
247. Beckmann MW, Niederacher D, Massenkeil G et al. Expression analyses of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu: no advantage of prediction of recurrence or survival in breast cancer patients. *Oncology.* 1996;53:441-447.
248. Kondo I, Shimizu N. Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13 leads to q22 region of chromosome 7. *Cytogenet Cell Genet.* 1983;35:9-14.
249. Haley J, Whittle N, Bennet P et al. The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Res.* 1987;1:375-396.
250. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature.* 1984;309:418-425.
251. Callaghan T, Antczak M, Flickinger T et al. A complete description of the EGF-receptor exon structure: implication in oncogenic activation and domain evolution. *Oncogene.* 1993;8:2939-2948.
252. Reiter JL, Threadgill DW, Eley GD et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics.* 2001;71:1-20.
253. Reiter JL, Maihle NJ. A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res.* 1996;24:4050-4056.
254. Flickinger TW, Maihle NJ, Kung HJ. An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. *Mol Cell Biol.* 1992;12:883-893.
255. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell.* 2003;12:541-552.
256. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;319:1-11.
257. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103:211-225.
258. Terai K, Matsuda M. Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Rep.* 2005;6:251-255.
259. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:174-179.



260. Duan R, Xie W, Burghardt RC et al. Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J Biol Chem.* 2001;276:11590-11598.
261. Chen RH, Abate C, Blenis J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:10952-10956.
262. Chung J, Uchida E, Grammer TC et al. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6508-6516.
263. Mikkola I, Bruun JA, Bjorkoy G et al. Phosphorylation of the transactivation domain of Pax6 by extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1999;274:15115-15126.
264. Grewal SS, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1999;9:544-553.
265. Nonami A, Kato R, Taniguchi K et al. Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells. *J Biol Chem.* 2004;279:52543-52551.
266. Sasaki A, Taketomi T, Kato R et al. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol.* 2003;5:427-432.
267. Wang X, Tournier C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cellular Signalling.* 2006;18:753-760.
268. Kato Y, Tapping RI, Huang S et al. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature.* 1998;395:713-716.
269. Prenzel N, Fischer OM, Streit S et al. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8:11-31.
270. Minden A, Lin A, Claret FX et al. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell.* 1995;81:1147-1157.
271. Coso OA, Chiariello M, Yu JC et al. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell.* 1995;81:1137-1146.
272. Dolfi F, Garcia-Guzman M, Ojaniemi M et al. The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:15394-15399.
273. Tassi E, Biesova Z, Di Fiore PP et al. Human JIK, a Novel Member of the STE20 Kinase Family That Inhibits JNK and Is Negatively Regulated by Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem.* 1999;274:33287-33295.

274. Bjorge JD, Chan TO, Antczak M et al. Activated type I phosphatidylinositol kinase is associated with the epidermal growth factor (EGF) receptor following EGF stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:3816-3820.
275. Rodrigues GA, Falasca M, Zhang Z et al. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*. 2000;20:1448-1459.
276. Alessi DR, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8:55-62.
277. Zimmermann S, Moelling K. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*. 1999;286:1741-1744.
278. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999;13:2905-2927.
279. Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:470-480.
280. Wilde A, Beattie EC, Lem L et al. EGF receptor signaling stimulates SRC kinase phosphorylation of clathrin, influencing clathrin redistribution and EGF uptake. *Cell*. 1999;96:677-687.
281. Maa MC, Leu TH, McCarley DJ et al. Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:6981-6985.
282. Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL et al. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1415-1420.
283. Biscardi JS, Maa MC, Tice DA et al. c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *J Biol Chem*. 1999;274:8335-8343.
284. Goi T, Shipitsin M, Lu Z et al. An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity. *EMBO J*. 2000;19:623-630.
285. Olayioye MA, Beuvink I, Horsch K et al. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1999;274:17209-17218.
286. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*. 2000;2:249-256.
287. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T et al. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*. 1994;372:786-791.
288. Ceresa BP, Schmid SL. Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12:204-210.

289. Waterman H, Sabanai I, Geiger B et al. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem.* 1998;273:13819-13827.
290. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, Van de Poll ML et al. Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J.* 1998;17:3385-3397.
291. Waterman H, Alroy I, Strano S et al. The C-terminus of the kinase-defective neuregulin receptor ErbB-3 confers mitogenic superiority and dictates endocytic routing. *EMBO J.* 1999;18:3348-3358.
292. Levkowitz G, Waterman H, Zamir E et al. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 1998;12:3663-3674.
293. Bao J, Alroy I, Waterman H et al. Threonine phosphorylation diverts internalized epidermal growth factor receptors from a degradative pathway to the recycling endosome. *J Biol Chem.* 2000;275:26178-26186.
294. Zwick E, Hackel PO, Prenzel N et al. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20:408-412.
295. Daub H, Weiss FU, Wallasch C et al. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature.* 1996;379:557-560.
296. King CR, Borrello I, Porter L et al. Ligand-independent tyrosine phosphorylation of EGF receptor and the erbB-2/neu proto-oncogene product is induced by hyperosmotic shock. *Oncogene.* 1989;4:13-18.
297. Knebel A, Rahmsdorf HJ, Ullrich A et al. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* 1996;15:5314-5325.
298. Lee SR, Kwon KS, Kim SR et al. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273:15366-15372.
299. Huang RP, Wu JX, Fan Y et al. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol.* 1996;133:211-220.
300. Cunnick JM, Dorsey JF, Standley T et al. Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 1998;273:14468-14475.
301. Chen CH, Cheng TH, Lin H et al. Reactive Oxygen Species Generation Is Involved in Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation through the Transient Oxidization of Src Homology 2-Containing Tyrosine Phosphatase in Endothelin-1 Signaling Pathway in Rat Cardiac Fibroblasts. *Mol Pharmacol.* 2006;69:1347-1355.
302. Beaucage P, Moreau P. EGF Receptor Transactivation in Angiotensin II and Endothelin Control of Vascular Protein Synthesis in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44 Suppl 1:S20-S23.

303. Shah BH, Catt KJ. Matrix metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in hypertension and left ventricular hypertrophy. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15:241-243.
304. Bokemeyer D, Schmitz U, Kramer HJ. Angiotensin II-induced growth of vascular smooth muscle cells requires an Src-dependent activation of the epidermal growth factor receptor. *Kidney Int.* 2000;58:549-558.
305. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H et al. Calcium-dependent Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation Mediates the Angiotensin II-induced Mitogen-activated Protein Kinase Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem.* 1998;273:8890-8896.
306. Zhang H, Chalothorn D, Jackson LF et al. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor Mediates Catecholamine-Induced Growth of Vascular Smooth Muscle. *Circ Res.* 2004;95:989-997.
307. Daub H, Wallasch C, Lanckenau A et al. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J.* 1997;16:7032-7044.
308. Zwick E, Daub H, Aoki N et al. Critical Role of Calcium- dependent Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation in PC12 Cell Membrane Depolarization and Bradykinin Signaling. *J Biol Chem.* 1997;272:24767-24770.
309. Gschwind A, Zwick E, Prenzel N et al. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene.* 2001;20:1594-1600.
310. Shah BH, Baukal AJ, Shah FB et al. Mechanisms of Extracellularly Regulated Kinases 1/2 Activation in Adrenal Glomerulosa Cells by Lysophosphatidic Acid and Epidermal Growth Factor. *Molecular Endocrinology.* 2005;19:2535-2548.
311. Stewart JR, O'Brian CA. Protein kinase C- $\alpha$  mediates epidermal growth factor receptor transactivation in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2005;4:726-732.
312. Hua H, Munk S, Whiteside CI. Endothelin-1 activates mesangial cell ERK1/2 via EGF-receptor transactivation and caveolin-1 interaction. *AJP - Renal Physiology.* 2003;284:F303-F312.
313. Gao Y, Tang S, Zhou S et al. The Thromboxane A2 Receptor Activates Mitogen-Activated Protein Kinase via Protein Kinase C-Dependent Gi Coupling and Src-Dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296:426-433.
314. Murasawa S, Mori Y, Nozawa Y et al. Angiotensin II Type 1 Receptor-Induced Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Activation Is Mediated by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor. *Circ Res.* 1998;82:1338-1348.

315. Shah BH, Neithardt A, Chu DB et al. Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *J Cell Physiol.* 2006;206:47-57.
316. Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T et al. Gbeta gamma Subunits Mediate Src-dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor. A SCAFFOLD FOR G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR-MEDIATED Ras ACTIVATION. *J Biol Chem.* 1997;272:4637-4644.
317. Keely SJ, Calandrella SO, Barrett KE. Carbachol-stimulated Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor and Mitogen-activated Protein Kinase in T84 Cells Is Mediated by Intracellular Ca<sup>2+</sup>, PYK-2, and p60src. *J Biol Chem.* 2000;275:12619-12625.
318. Della Rocca GJ, Maudsley S, Daaka Y et al. Pleiotropic Coupling of G Protein-coupled Receptors to the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade. Role of focal adhesions and receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1999;274:13978-13984.
319. Dikic I, Tokiwa G, Lev S et al. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature.* 1996;383:547-550.
320. Frank GD, Eguchi S. Activation of tyrosine kinases by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: significance and involvement of EGF receptor transactivation by angiotensin II. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5:771-780.
321. Prenzel N, Zwick E, Daub H et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature.* 1999;402:884-888.
322. Jackson LF, Qiu TH, Sunnarborg SW et al. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J.* 2003;22:2704-2716.
323. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science.* 1998;282:1281-1284.
324. Sahin U, Weskamp G, Kelly K et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol.* 2004;164:769-779.
325. Ohtsu H, Dempsey PJ, Eguchi S. ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *AJP - Cell Physiology.* 2006;291:C1-10.
326. Yamazaki S, Iwamoto R, Saeki K et al. Mice with defects in HB-EGF ectodomain shedding show severe developmental abnormalities. *J Cell Biol.* 2003;163:469-475.
327. Asakura M, Kitakaze M, Takashima S et al. Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med.* 2002;8:35-40.
328. Thomas WG, Brandenburger Y, Autelitano DJ et al. Adenoviral-Directed Expression of the Type 1A Angiotensin Receptor Promotes Cardiomyocyte Hypertrophy via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor. *Circ Res.* 2002;90:135-142.

329. Saito S, Frank GD, Motley ED et al. Metalloprotease inhibitor blocks angiotensin II-induced migration through inhibition of epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294:1023-1029.
330. Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S et al. Involvement of Metalloproteinases 2/9 in Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation in Pressure-Induced Myogenic Tone in Mouse Mesenteric Resistance Arteries. *Circulation.* 2004;110:3587-3593.
331. Yamauchi T, Ueki K, Tobe K et al. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature.* 1997;390:91-96.
332. Huang Y, Kim SO, Jiang J et al. Growth Hormone-induced Phosphorylation of Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor in 3T3-F442A Cells: MODULATION OF EGF-INDUCED TRAFFICKING AND SIGNALING. *J Biol Chem.* 2003;278:18902-18913.
333. Moro L, Dolce L, Cabodi S et al. Integrin-induced Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor Activation Requires c-Src and p130Cas and Leads to Phosphorylation of Specific EGF Receptor Tyrosines. *J Biol Chem.* 2002;277:9405-9414.
334. Lin SY, Makino K, Xia W et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol.* 2001;3:802-808.
335. Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer.* 2006;94:184-188.
336. Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y et al. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J Cell Biochem.* 2006.
337. Flamant M, Tharaux PL, Placier S et al. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates the tonic and fibrogenic effects of endothelin in the aortic wall of transgenic mice. *FASEB J.* 2003;17:327-329.
338. Kagiya S, Qian K, Kagiya T et al. Antisense to epidermal growth factor receptor prevents the development of left ventricular hypertrophy. *Hypertension.* 2003;41:824-829.
339. Kagiya S, Eguchi S, Frank GD et al. Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy and Hypertension Are Attenuated by Epidermal Growth Factor Receptor Antisense. *Circulation.* 2002;106:909-912.
340. Florian JA, Dorrance A, Webb RC et al. Mineralocorticoids upregulate arterial contraction to epidermal growth factor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol JID - 100901230.* 2001;281:R878-R886.
341. Dorrance AM, Osborn HL, Grekin R et al. Spironolactone reduces cerebral infarct size and EGF-receptor mRNA in stroke-prone rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281:R944-R950.
342. Schreiber E, Harshman K, Kemler I et al. Astrocytes and glioblastoma cells express novel octamer-DNA binding proteins distinct from the ubiquitous Oct-1 and B cell type Oct-2 proteins. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:5495-5503.

343. Versteeg HH, Nijhuis E, Van den Brink GR et al. A new phosphospecific cell-based ELISA for p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, protein kinase B and cAMP-response-element-binding protein. *Biochem J.* 2000;350 Pt 3:717-722.
344. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem.* 1985;260:3440-3450.
345. Northcott C, Florian JA, Dorrance A et al. Arterial Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Hypertension. *Hypertension.* 2001;38:1337-1341.
346. Young M, Fullerton M, Dilley R et al. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest.* 1994;93:2578-2583.
347. Hashikabe Y, Suzuki K, Jojima T et al. Aldosterone impairs vascular endothelial cell function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47:609-613.
348. Min LJ, Mogi M, Li JM et al. Aldosterone and Angiotensin II Synergistically Induce Mitogenic Response in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 2005;97:434-442.
349. Poulsen SH, Host NB, Jensen SE et al. Relationship between serum amino-terminal propeptide of type III procollagen and changes of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2000;101:1527-1532.
350. Terzi F, Burtin M, Hekmati M et al. Targeted expression of a dominant-negative EGF-R in the kidney reduces tubulo-interstitial lesions after renal injury. *J Clin Invest.* 2000;106:225-234.
351. Francois H, Placier S, Flamant M et al. Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition. *FASEB J.* 2004;18:926-928.
352. Kawanabe Y, Masaki T, Hashimoto N. Involvement of epidermal growth factor receptor-protein tyrosine kinase transactivation in endothelin-1-induced vascular contraction. *J Neurosurg.* 2004;100:1066-1071.
353. Shah BH, Catt KJ. A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II - induced cardiac hypertrophy. *Trends in Pharmacological Sciences.* 2003;24:239-244.
354. Eguchi S, Inagami T. Signal transduction of angiotensin II type 1 receptor through receptor tyrosine kinase. *Regul Pept.* 2000;91:13-20.
355. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW et al. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:931-936.
356. Chansel D, Ciroidi M, Vandermeersch S et al. Heparin binding EGF is necessary for vasospastic response to endothelin. *FASEB J.* 2006;fj.
357. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H et al. Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology.* 1999;140:4659-4668.

358. Switzer BR, Summer GK. A Modified Fluorometric Micromethod for DNA. *Clin Chim Acta*. 1971;32:203-206.
359. Krug AW, Schuster C, Gassner B et al. Human EGF receptor 1 (HER1) expression renders CHO cells sensitive to alternative aldosterone signaling. *J Biol Chem*. 2002;277:45892-45897.
360. Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S et al. Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282:F669-F679.
361. Tsybouleva N, Zhang L, Chen S et al. Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2004;109:1284-1291.
362. Fuller PJ, Young MJ. Mechanisms of Mineralocorticoid Action. *Hypertension*. 2005;01.
363. Chun TY, Bloem LJ, Pratt JH. Aldosterone Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase in Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Endocrinology*. 2003;144:1712-1717.
364. Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM et al. Aldosterone Stimulates Matrix Metalloproteinases and Reactive Oxygen Species in Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Hypertension*. 2005;46:555-561.
365. Chun TY, Pratt JH. Aldosterone increases plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;239:55-61.
366. Fiebeler A, Schmidt F, Muller DN et al. Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappab activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension*. 2001;37:787-793.
367. Stockand JD, Meszaros JG. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H176-H184.
368. Mazak I, Fiebeler A, Muller DN et al. Aldosterone Potentiates Angiotensin II-Induced Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 2004;109:2792-2800.
369. Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H et al. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal and intercalated cell properties. *Pflügers Arch*. 1994;428:157-162.
370. Ishii S, Xu YH, Stratton RH et al. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:4920-4924.
371. Johnson AC, Ishii S, Jinno Y et al. Epidermal growth factor receptor gene promoter. Deletion analysis and identification of nuclear protein binding sites. *J Biol Chem*. 1988;263:5693-5699.



372. Kageyama R, Merlino GT, Pastan I. Nuclear factor ETF specifically stimulates transcription from promoters without TATA box. *J Biol Chem.* 1989;264:15508-15514.
373. Chen LL, Clawson ML, Bilgrami S et al. A sequence-specific single-stranded DNA-binding protein that is responsive to epidermal growth factor recognizes an S1 nuclease-sensitive region in the epidermal growth factor receptor promoter. *Cell Growth Differ.* 1993;4:975-983.
374. Ludes-Meyers JH, Subler MA, Shivakumar CV et al. Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol.* 1996;16:6009-6019.
375. Sheikh MS, Carrier F, Johnson AC et al. Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promoter. *Oncogene.* 1997;15:1095-1101.
376. Hou X, Johnson AC, Rosner MR. Identification of an epidermal growth factor receptor transcriptional repressor. *J Biol Chem.* 1994;269:4307-4312.
377. Kageyama R, Pastan I. Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. *Cell.* 1989;59:815-825.
378. Jetten AM. Retinoids specifically enhance the number of epidermal growth factor receptors. *Nature.* 1980;284:626-629.
379. Mukku VR, Stancel GM. Regulation of epidermal growth factor receptor by estrogen. *J Biol Chem.* 1985;260:9820-9824.
380. Mukku VR. Regulation of epidermal growth factor receptor levels by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 1984;259:6543-6547.
381. Xu J, Thompson KL, Shephard LB et al. T3 receptor suppression of Sp1-dependent transcription from the epidermal growth factor receptor promoter via overlapping DNA-binding sites. *J Biol Chem.* 1993;268:16065-16073.
382. Johnson AC. Activation of epidermal growth factor receptor gene transcription by phorbol 12-myristate 13-acetate is mediated by activator protein 2. *J Biol Chem.* 1996;271:3033-3038.
383. Schafer JA. Abnormal regulation of ENaC: syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283:F221-F235.
384. Diakov A, Korbmayer 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;279:38134-38142.
385. Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;217:203-212.
386. Danto SI, Borok Z, Zhang XL et al. Mechanisms of EGF-induced stimulation of sodium reabsorption by alveolar epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998;275:C82-C92.

387. Khurana S, Nath SK, Levine SA et al. Brush border phosphatidylinositol 3-kinase mediates epidermal growth factor stimulation of intestinal NaCl absorption and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Biol Chem*. 1996;271:9919-9927.
388. Ookawara S, Tabei K, Furuya H et al. The effect of EGF on electrolyte transport is mediated by tyrosine kinases in the rabbit cortical collecting duct. *Miner Electrolyte Metab*. 1999;25:191-198.
389. Shen JP, Cotton CU. Epidermal growth factor inhibits amiloride-sensitive sodium absorption in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;284:F57-F64.
390. Warden DH, Stokes JB. EGF and PGE2 inhibit rabbit CCD Na<sup>+</sup> transport by different mechanisms: PGE2 inhibits Na<sup>(+)</sup>-K<sup>+</sup> pump. *Am J Physiol*. 1993;264:F670-F677.
391. Bhalla V, Daidie D, Li H et al. Serum- and Glucocorticoid-Regulated Kinase 1 Regulates Ubiquitin Ligase Neural Precursor Cell-Expressed, Developmentally Down-Regulated Protein 4-2 by Inducing Interaction with 14-3-3. *Molecular Endocrinology*. 2005;19:3073-3084.
392. Uhrenholt TR, Schjerning J, Hansen PB et al. Rapid Inhibition of Vasoconstriction in Renal Afferent Arterioles by Aldosterone. *Circ Res*. 2003;93:1258-1266.
393. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids*. 2000;65:61-73.
394. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via *trans*-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1649-1660.
395. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: Stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol*. 2002;16:70-84.
396. Gametchu B, Watson CS, Wu S. Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J*. 1993;7:1283-1292.
397. Bartholome Burk, Spies CM, Gaber Timo et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J*. 2004;18:70-80.
398. Mihailidou AS, Funder JW. Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids*. 2005;70:347-351.
399. Good DW, George T, Watts BA, III. Aldosterone potentiates 1,25-dihydroxyvitamin D3 action in renal thick ascending limb via a nongenomic, ERK-dependent pathway. *AJP - Cell Physiology*. 2003;285:C1122-C1130.

400. Ishizawa K, Izawa Y, Ito H et al. Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. *Hypertension*. 2005;46:1046-1052.
401. Rossol-Haseroth K, Zhou Q, Braun S et al. Mineralocorticoid receptor antagonists do not block rapid ERK activation by aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;318:281-288.
402. Fiebeler A, Luft FC. The Mineralocorticoid Receptor and Oxidative Stress. *Heart Failure Reviews*. 2005;10:47-52.
403. Cato ACB, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Science's STKE*. 2002;138:1-11.
404. Seval Y, Cakmak H, Kayisli UA et al. Estrogen-Mediated Regulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Human Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:2349-2357.
405. Qi AQ, Qiu J, Xiao L et al. Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells. *J Neurosci Res*. 2005;80:510-517.
406. Chai W, Garrelds IM, de Vries R et al. Nongenomic Effects of Aldosterone in the Human Heart: Interaction With Angiotensin II. *Hypertension*. 2005;46:701-706.
407. Callera GE, Montezano ACI, Yogi A et al. c-Src-Dependent Nongenomic Signaling Responses to Aldosterone Are Increased in Vascular Myocytes From Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2005;01.
408. Gunaruwan P, Schmitt M, Sharman J et al. Effects of aldosterone on forearm vasculature in treated chronic heart failure. *The American Journal of Cardiology*. 2005;95:412-414.
409. Fujita M, Minamino T, Asanuma H et al. Aldosterone Nongenomically Worsens Ischemia Via Protein Kinase C-Dependent Pathways in Hypoperfused Canine Hearts. *Hypertension*. 2005;46:113-117.
410. Uhrenholt TR, Jensen BL, Skott O. Rapid nongenomic effect of aldosterone on vasoconstriction. *Hypertension*. 2004;43:e30.
411. Feng W, Webb P, Nguyen P et al. Potentiation of estrogen receptor activation function 1 (AF-1) by Src/JNK through a serine 118-independent pathway. *Mol Endocrinol*. 2001;15:32-45.
412. Vasudevan N, Kow LM, Pfaff DW. Early membrane estrogenic effects required for full expression of slower genomic actions in a nerve cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12267-12271.
413. Ueda Y, Hirai S, Osada S et al. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem*. 1996;271:23512-23519.
414. Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol*. 2003;17:309-317.

415. Li S, Sato S, Yang X et al. Pyk2 activation is integral to acid stimulation of sodium/hydrogen exchanger 3. *J Clin Invest.* 2004;114:1782-1789.
416. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:180-186.
417. Harvey BJ, Higgins M. Nongenomic effects of aldosterone on Ca<sup>2+</sup> in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int.* 2000;57:1395-1403.
418. Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:46-56.
419. Hammes SR. The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2168-2170.
420. Kousteni S, Han L, Chen JR et al. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest.* 2003;111:1651-1664.
421. Lange CA. Making Sense of Cross-Talk between Steroid Hormone Receptors and Intracellular Signaling Pathways: Who Will Have the Last Word? *Molecular Endocrinology.* 2004;18:269-278.
422. Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M et al. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem.* 2002;277:50768-50775.
423. Pfau A, Grossmann C, Freudinger R et al. Ca<sup>2+</sup> but not H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Modulates GRE-Element Activation by the Human Mineralocorticoid Receptor in HEK Cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;in press.
424. Galigniana MD, Piwien Pilipuk G, Kanelakis KC et al. Molecular mechanism of activation and nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor upon binding of pregnanesterooids. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;217:167-179.
425. Tanaka M, Nishi M, Morimoto M et al. Imaging analysis of mineralocorticoid receptor and importins in single living cells by using GFP color variants. *Cell Tissue Res.* 2005;320:447-453.
426. Walther RF, Atlas E, Carrigan A 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;280:17549-17561.

## 8. Danksagungen

Ich möchte mich ganz besonders bei Herrn Prof. Gekle für die Überlassung des Themas, die ständige Motivation und die engagierte Betreuung bedanken. Bei Herrn Prof. Silbernagl und seiner Nachfolgerin Frau Prof. Kuhn möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in den Lehrstuhl und für die Mitbenutzung der Laboreinrichtungen bedanken. Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Benz für die unkomplizierte Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Biologischen Fakultät.

Mein Dank gilt zusätzlich Herrn Dr. A. Krug für die Einführung in das Thema und die vielen Vorarbeiten sowie Herrn Dr. A. Benesic für die Hilfe bei den Calciummessungen.

Außerdem möchte ich mich für die Betreuung und Hilfe in labortechnischen Angelegenheiten bei Frau Freudinger, Frau Mildenberger und Frau Wirth bedanken, besonders bezüglich der Zellkultur, den Reporter-Gen-Assays und den ELISAs.

Mein Dank gilt ferner Frau Gaßner, insbesondere für die Hilfe bei der Zellkultur und den Klonierungen, Frau Völker für die tierexperimentellen Untersuchungen und Frau Holzinger und Frau Schulze für ihre allgemeine Unterstützung im Labor.

Für Ratschläge und hilfreiche Diskussionen danke ich auch Frau PD Drumm, Herrn PD Schwerdt und Herrn PD Sauvart.

Danke auch an alle weiteren Mitarbeiter des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen hilfreichen Tipps.

Dr. F. Isken und meinen Eltern danke ich für ihre Geduld, aufmunternde Anteilnahme, das Korrekturlesen und alles Weitere.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des MD/PhD-Programmes des IZKF Würzburg.



## 9. Lebenslauf

### Personendaten:

**Name:** Claudia Großmann  
**Geburtstag:** 25.04.1974  
**Geburtsort:** Berlin

### Schulzeit:

**1980 - 1993** Grundschule und Gymnasium der Deutsch-Amerikanischen John-F.-Kennedy-Schule Berlin

- 1992 High School Diploma
- 1993 Abitur

### Studienzeit:

**1993- 2000** Medizinstudium an der Freien Universität Berlin

### medizinische Doktorarbeit:

**2002** medizinische Doktorarbeit im Labor von Prof. W. Oelkers (Medizinische Klinik IV, Abteilung für Endokrinologie der Charité Campus Benjamin Franklin in Berlin): Suche nach einem selektiven Inhibitor der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-1

### Berufliche Laufbahn:

**2000–2002** ÄiP und nach Erhalt der Approbation Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin bei Prof. W. Oelkers / Prof. A.F.H. Pfeiffer an der Charité Campus Benjamin Franklin in Berlin

**2002** Stipendiatin des MD/PhD-Programmes des IZKF der Universität Würzburg

**ab 2003** naturwissenschaftliche Doktorarbeit bei Prof. Gekle im Physiologischen Institut der Universität Würzburg (Betreuung aus dem Biozentrum der Universität Würzburg durch Prof. R. Benz, Biotechnologie)





## 10. Publikationen

- Quinkler M., Johannsen S., Grossmann C., Baehr V., Mueller M., Oelkers W., Diederich S. Progesterone metabolism in the human kidney and inhibitors of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by progesterone and its metabolites. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84 (11): 4165-4171.
- Diederich S., Quinkler M., Burkhardt P., Grossmann C., Baehr V., Oelkers W. 11-beta-hydroxysteroid-dehydrogenase isoforms: tissue distribution and implications for clinical medicine. *Eur J Clin Invest.* 2000; Suppl 3: 21-27. Review.
- Diederich S., Grossmann C., Hanke B., Quinkler M. Hermann M., Baehr V., Oelkers W. In the search for specific inhibitors of human 11beta-hydroxysteroid-dehydrogenases (11beta-HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11-beta-HSD-I. *Eur J Endocrinol.* 2000; 142 (2): 200-207.
- Quinkler M., Meyer B., Bumke-Vogt C., Grossmann C., Gruber U., Oelkers W., Diederich S., Baehr V. Agonistic and antagonistic properties of progesterone metabolites at the human mineralocorticoid receptor. *Eur J Endocrinol.* 2002; 146 (6): 789-799.
- Krug A.W.\*, Grossmann C.\*, Schuster C., Freudinger R., Mildenerger S., Govindan MV., Gekle M. Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem.* 2003; 278 (44): 43060-43066.
- Grossmann C., Freudinger R., Mildenerger S., Krug AW., Gekle M. Evidence for epidermal growth factor receptor as negative-feedback control in aldosterone-induced Na<sup>+</sup>-reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 286 (6): F1226-1231.
- Grossmann C., Scholz T., Rochel M., Bumke-Vogt C., Oelkers W., Pfeiffer AFH., Diederich S., Baehr V. Transactivation via the human glucocorticoid and mineralocorticoid receptor by therapeutically used steroids in CV-1 cells: a comparison of their glucocorticoid and mineralocorticoid properties. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151 (3): 397-406.
- Grossmann C.\*, Benesic A.\*, Krug AW., Freudinger R., Mildenerger S., Gassner B., Gekle, M. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol.* 2005; 19 (7): 1697-1710.
- 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.* 2006; in press.

- Grossmann C., Krug AW., Freudinger R., Mildenerger S., Voelker K., Gekle M.  
Aldosterone-induced Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression:  
Interaction Between the Human Mineralocorticoid Receptor and the Human EGFR  
Promoter, in preparation.

Preise:

- Posterpreis der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie 2006
- First Place Winner: International Aldosterone Conference: Young Investigator  
Competition 2006

Eingeladene Vorträge:

- ESAC (European Section of the Aldosterone Council) 2005 in Nancy, Frankreich.
- 5<sup>th</sup> International Meeting: Rapid Responses to Steroid Hormones 2007 in Dublin, Irland.

## 11. Erklärungen

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre hiermit auch, dass die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation den ersten Versuch von mir darstellt, den naturwissenschaftlichen Doktorgrad zu erwerben, wobei ich bereits an der Freien Universität von Berlin an der medizinischen Fakultät promoviert habe (Dr. med.).