

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. M. Kuhn

**Modulation der Aldosteron-induzierten Transaktivierungsaktivität
des Mineralokortikoidrezeptors –
Rolle von Calcium, Proteinkinase C, PI-3-Kinase sowie H₂O₂**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Anja Pfau
aus Haßfurt

Würzburg, Oktober 2009

Referent: Prof. Dr. med. M. Gekle
Koreferent: Prof. Dr. med. B. Allolio
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2010

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 1 -
1.1. Mineralokortikoidrezeptor und Aldosteron	- 1 -
1.1.1 Biochemische Charakterisierung: Aldosteron	- 1 -
1.1.2 Biochemische Charakterisierung: Mineralokortikoidrezeptor	- 3 -
1.1.2.1 Gene	- 3 -
1.1.2.2 Struktur	- 4 -
1.1.3 MR-Selektivität	- 7 -
1.1.4 Funktionsweise: MR/Aldosteron	- 8 -
1.1.5 Wirkungen des MR	- 9 -
1.1.5.1 Epitheliale genomische Effekte	- 10 -
1.1.5.2 Nicht-epitheliale Effekte von Aldosteron/MR	- 12 -
1.1.5.3 Nicht-genotrope Effekte von Aldosteron	- 15 -
1.2. Ausgewählte second messenger, die in Interaktion mit dem MR treten	- 16 -
1.2.1 Calcium	- 17 -
1.2.2 Proteinkinase C	- 17 -
1.2.3 PI-3-Kinase	- 18 -
1.2.4 ROS	- 19 -
1.3. Zielsetzung dieser Arbeit	- 21 -
2. Material und Methoden	- 22 -
2.1 Zellkultur	- 22 -
2.2 Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationen	- 23 -
2.3 Transfektion und Reporter-gen-Assay	- 24 -
2.4 Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay	- 26 -
2.5 β -Galaktosidase-Assay	- 27 -
2.6 EGFP-Fluoreszenz	- 27 -
2.7 Bestimmung der EGFP-hMR-Expression mittels ELISA	- 28 -
2.8 Radikalmessung mittels $H_2DCFDA/H_2DCFDA-AM$	- 29 -
2.9 Plasmidgewinnung	- 29 -

2.10 Materialien.....	- 30 -
2.11 Statistik.....	- 30 -
3. Ergebnisse	- 31 -
3.1 Grundlagen: SEAP-GRE-Aktivität in HEK- und HEK-MR-Zellen.....	- 31 -
3.2 Wirkung von Calcium auf den hMR	- 33 -
3.2.1 Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration	- 34 -
3.2.2 Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration	- 36 -
3.3 Wirkung der Proteinkinase C auf den hMR	- 39 -
3.3.1 Hemmung der Proteinkinase C.....	- 39 -
3.3.2 Aktivierung der Proteinkinase C	- 40 -
3.4 Wirkung der PI-3-Kinase auf EGFP-hMR.....	- 42 -
3.5 H ₂ O ₂ und der MR	- 43 -
3.5.1 Wirkung von H ₂ O ₂ auf die intrazelluläre ROS-Homöostase.....	- 43 -
3.5.2 Wirkung von H ₂ O ₂ auf die SEAP-GRE-Aktivität.....	- 44 -
3.5.2.1 Herunterregulierung der SEAP-GRE-Aktivität durch H ₂ O ₂	- 44 -
3.5.2.2 Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Aldosteron-induzierte Transaktivierungsaktivität des MR	- 48 -
3.5.3 Einfluss von H ₂ O ₂ auf den Transport des MR in den Nukleus	- 50 -
3.5.4 Einfluss von Aldosteron auf den Redox-Haushalt der Zelle	- 52 -
4. Diskussion.....	- 54 -
4.1 Einfluss der intrazellulären Calcium-Konzentration auf die Aldosteron-abhängige hMR-Transaktivierungsaktivität.....	- 54 -
4.2 Einfluss der Proteinkinase C auf die Aldosteron-abhängige hMR- Transaktivierungsaktivität	- 54 -
4.3 Einfluss der PI-3-Kinase auf die Aldosteron-abhängige hMR- Transaktivierungsaktivität	- 55 -
4.4. Einfluss von H ₂ O ₂ auf den MR	- 56 -
4.4.1 Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Aldosteron-abhängige hMR- Transaktivierungsaktivität	- 56 -
4.4.2 Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Lokalisation des EGFP-hMR.....	- 59 -

5. Zusammenfassung	- 60 -
6. Ausblick	- 62 -
7. Abkürzungsverzeichnis	- 63 -
8. Literaturverzeichnis	- 65 -
9. Abbildungsverzeichnis	- 77 -

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Aldosteron, ein Steroidhormon, ist essentiell für die Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes und des Blutdrucks. Es ist bekannt, dass Aldosteron seine klassische Wirkung durch Modulation der Proteinexpression nach Bindung an seinen intrazellulären Rezeptor, den Mineralokortikoidrezeptor (MR), vermittelt (1).

Außerdem erkannte man, dass Aldosteron noch andere Fähigkeiten hat: so führt es an Gefäßen, am Herz und in der Niere zu pathologischen Gewebsveränderungen wie Fibrose und Entzündung (2-4). Die klinische Bedeutung dieser Effekte konnte durch Studien wie die RALES- und EPHEsus-Studie untermauert werden, die beide zeigen konnten, dass MR-Antagonisten die Mortalitätsrate bei Herzinsuffizienz und nach Myokardinfarkt signifikant senken (5;6).

Die molekularen Hintergründe hierfür sind nur teilweise bekannt.

Gleichzeitig entdeckte man aber auch, dass Aldosteron neben seiner klassischen genomischen Funktionsweise noch auf andere „nicht-genotrope“ Weise wirkt, indem es beispielsweise zur schnellen Aktivierung von Proteinkinasen oder des Calciumeinstroms in die Zelle führt (7).

Für andere Steroidhormonrezeptoren (z.B. Östrogen- und Progesteronrezeptor) ist bekannt, dass ihre Aktivität durch zytosolische Signalwege (z.B. Proteinkinasen) moduliert wird (8;9). Die Vermutung liegt also nahe, dass die klassische genomische Aldosteron-Wirkung, also die Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung, auch zusätzlich durch andere Signalwege und Signalmoleküle moduliert wird.

1.1. Mineralokortikoidrezeptor und Aldosteron

1.1.1 Biochemische Charakterisierung: Aldosteron (3;10-14)

Aldosteron ist Teil der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Hormonkaskade, die den Salz- und Wasserhaushalt und damit den Blutdruck regelt. (s. Abb. 1)

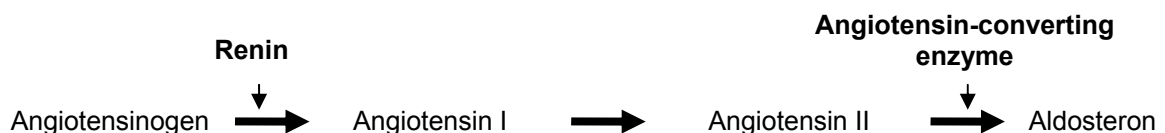


Abb. 1: RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Renin ist eine Peptidase und wird in den Granula-Zellen des Juxtaglomerulären Apparates gebildet. Seine Freisetzung wird stimuliert durch Natriummangel, Hypovolämie, Minderung der renalen Perfusion sowie durch Aktivierung von β 1-Rezeptoren (d.h. bei Sympathikusaktivierung).

Angiotensinogen wird in der Leber gebildet.

Das „Angiotensin-converting enzyme“ kommt in 3 Isoformen vor: als alpha-ACE kommt es vor allem in den Endothelzellen der Lungengefäße vor. Beta- und gamma-ACE finden sich in den Endothelien der Nierengefäße.

Insgesamt gelten als die wichtigsten Stimuli für die Aldosteron-Freisetzung Angiotensin II und K^+ (13), außerdem ACTH.

Aldosteron ist ein Steroidhormon, d.h. sein Grundgerüst leitet sich vom Cholesterin ab, aus dem zu allererst Progesteron synthetisiert wird, von dem sich dann alle anderen Steroidhormone ableiten. Die Biosynthese des Aldosterons verläuft hierbei ausgehend von Cholesterin über Pregnenolon zu Progesteron, zu 11-Deoxycorticosteron, zu Corticosteron und schließlich zu 18-Hydrocorticosteron, welches nach Oxidation zu Aldosteron wird (1) (s. Abb. 2).

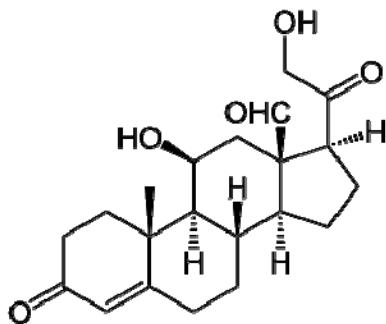


Abb. 2:
Strukturformel von Aldosteron
(<http://de.wikipedia.org/wiki/Aldosteron>)

Aldosteron wird hauptsächlich in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet (3).

Allerdings mehrten sich in den letzten 15 Jahren die Hinweise darauf, dass auch im Herzen, in Gefäßwandzellen und im Gehirn eine Aldosteron-Produktion stattfindet (15-17). Man geht vor allem von auto- und parakrinen Wirkungen dieser extraadrenalen Aldosteron-Synthese aus (15), z.B. durch eine zentrale Beeinflussung der Blutdruckregulation durch im Gehirn gebildetes Aldosteron.

Die Aldosteron-De-novo-Synthese wird vor allem im Herzen in einem pathophysiologischen Zusammenhang gesehen: so konnten Young et al. nur im insuffizienten Herz, nicht aber im gesunden menschlichen Herz die Expression von Aldosteron-Synthase (=18-Hydroxylase), dem Schlüsselenzym der Aldosteronbildung, nachweisen (18). Nach Myokardinfarkt kann man ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Aldosteron-Konzentration im Herzgewebe feststellen (19). Allerdings sind die Ergebnisse nicht einheitlich. So postulierte Rudolph 2000 (20), dass die kardiale Aldosteron-Synthese starken spezies- und geschlechtsspezifischen Schwankungen unterworfen sei.

Abhängig vom Labor und den angewandten Methoden differieren die numerischen Messwerte teilweise stark (16;21); Gomez-Sanchez (21) kommt zu dem Ergebnis, dass die im Herzen nachweisbare Aldosteron-Konzentration sich allein durch den Aldosteron-Plasmaspiegel erklären lässt ohne Anhalt für eine lokale de-novo-Synthese.

Zusammenfassend, unter Berücksichtigung aller bisherigen Ergebnisse, kann man folgendes über die kardiale Aldosteron-Synthese sagen (12): Eine sehr geringe Produktion von Aldosteron im Herzen ist wohl prinzipiell möglich, da die nötigen Enzyme vorhanden sind, aber diese minimale Aldosteron-Produktion scheint wenn, dann nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, was die Pathophysiologie von Aldosteron im Herzen angeht (12).

Letztlich ist aber die Bedeutung der extraadrenalen Aldosteron-Synthese noch nicht abschließend geklärt.

1.1.2 Biochemische Charakterisierung: Mineralokortikoidrezeptor

1.1.2.1 Gene (22-25)

Das Gen für den hMR liegt auf Chromosom 4q31.1– 4q31.2 und besteht aus 10 Exons.

Der N-terminale Teil des MR wird von Exon 2 gebildet; zwei kleine Exons, nämlich 3 und 4, kodieren für je einen der beiden Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne des MR, und die Exons 5-9 kodieren für die Hormonbindungsdomäne des MR (24).

Die Exons 1 α und 1 β werden nicht translatiert, sondern wirken modulierend auf Transkription und Translation ein. Die 5'-Enden von 1 α und 1 β entsprechen zwei unterschiedlichen MR-Promotoren, P1 (proximal) und P2 (distal) (25). Sie führen zur

Entstehung zweier unterschiedlicher mRNA-Varianten des hMR, nämlich hMR α und hMR β .

Der P1-Promotor scheint hierbei die höhere basale Aktivität aufzuweisen und damit der aktivere der beiden Promotoren zu sein (23;25).

Beide hMR-Promotoren, P1 und P2, reagieren auf Glukokortikoid-aktivierten hGR, aber nur P2 kann durch den Aldosteron-aktivierten hMR aktiviert werden. In den bisherigen Ergebnissen konnte allerdings im P2-Promotor keine direkte Bindungsstelle für den hMR identifiziert werden; es ist davon auszugehen, dass die Aktivierung des P2-Promotors durch den hMR kein isoliertes Phänomen darstellt, sondern diese Aktivierung im Rahmen eines komplexen Regulationsmechanismus stattfindet, bei dem verschiedene Botenstoffe und Transkriptionsfaktoren ineinander greifen (25).

Der P1-Promotor ist in allen MR-exprimierenden Geweben aktiv (Niere, Kolon, Herz, Gehirn, Speicheldrüsen, Fettgewebe, Gewebe des Reproduktionstraktes), während der P2-Promotor vor allem in der Fetalzeit und durch spezifische Induktion während bestimmter Entwicklungsstadien eine Rolle zu spielen scheint (23).

Die Translationsprodukte beider mRNA-Varianten sind identisch. Eine dritte mRNA-Variante des MR, MR γ , wurde bisher nur im Ratten-Hippocampus beschrieben (22).

1.1.2.2 Struktur (14;26-28)

Der MR besteht aus 784 Aminosäuren (29).

Die Struktur aller Steroidhormonrezeptoren folgt im Großen und Ganzen dem gleichen Bauprinzip (26;30). Grob kann man anhand Abb. 3 folgenden Aufbau erkennen:

Auf eine N-terminale Domäne (A/B) folgt eine zentral gelegene DNA-Bindungsdomäne (C), die durch eine „Scharnierregion“ (D) an die C-terminale Liganden-Bindungsdomäne angekoppelt ist.

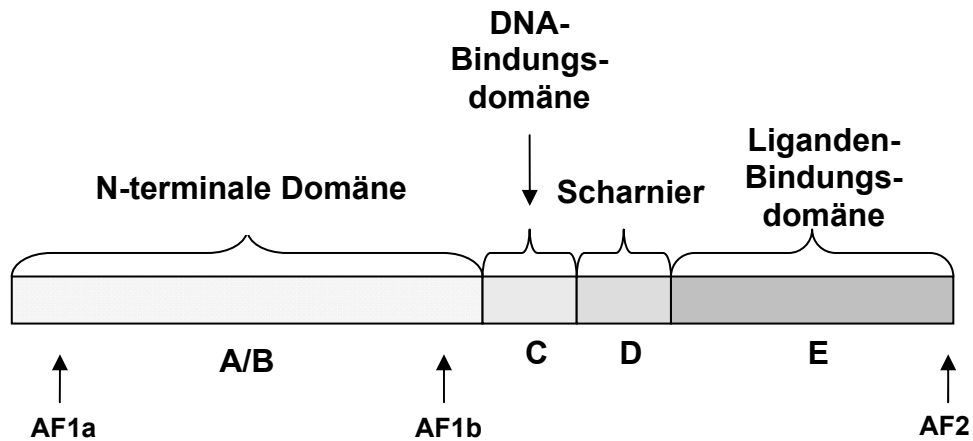


Abb. 3: schematischer Aufbau der Grundstruktur aller Steroidrezeptoren

Im Einzelnen heißt das für den MR:

a) N-terminale Domäne (NTD) (28):

Die NTD (Exon 2, s. 1.1.2.1) des MR ist die längste unter allen Steroidhormonrezeptoren; unter allen SR besteht eine große Variabilität hinsichtlich der NTD, sie weisen untereinander lediglich eine 15%ige Übereinstimmung auf.

Die NTD spielt eine wichtige Rolle in der Liganden-unabhängigen Transaktivierung bzw. -repression.

Zwei Aktivierungsdomänen innerhalb der NTD wurden dazu bisher identifiziert, nämlich AF1a (AS 1-167) und AF1b (AS 445-602) (AF 1 = activation function 1 domain).

Zwischen diesen beiden Aktivierungsdomänen liegt in der NTD eine zentrale inhibitorische Domäne (AS 163-437).

AF-1a und AF-1b interagieren mit einer Reihe weiterer Coregulatoren und sind in hohem Maße verantwortlich für eine äußerst selektive Aktivierung des MR, wie man sie bei anderen SRs nur bedingt findet.

b) DNA-Bindungsdomäne (DBD) (28):

Wie der Name schon sagt, besteht die Bedeutung der DBD (aus Exon 3 und 4) in der Erkennung der für die Interaktion mit dem MR spezifischen DNA-Sequenzen, auch als HRE (hormone response element) bezeichnet. MR und GR benutzen dieselbe HRE; dies verwundert nicht zu sehr, da die DBD des MR zu 94% identisch ist mit der DBD des GR.

Die DBD besteht aus zwei Zinkfingern; der erste Zinkfinger ist verantwortlich für eine feste Bindung an die DNA; der zweite Finger erleichtert die Dimerisierung mit

einem zweiten SR, entweder mit sich selbst (Homodimerisierung) oder mit einem anderen Vertreter aus der Familie der SR (Heterodimerisierung) – ein Vorgang, der unentbehrlich ist für die Bindung an und Aktivierung des HRE (s. Abschnitt 1.1.4).

c) Scharnier-Region (27):

Die Prolin-reiche hinge-Region (AS 671-732) ist in der Lage, die DBD relativ zur LBD so umzulagern, dass der MR mit der DNA in Kontakt tritt. Darüberhinaus besitzt die Scharnierregion eine Region namens NLS1, die eine Rolle bei der Bildung der MR-Homodimere (keine Heterodimere) spielen soll; außerdem dient sie als schwaches ligandenunabhängiges nukleäres Lokalisationssignal.

d) Liganden-Bindungsdomäne (LBD) (27;28):

Die LBD ist innerhalb der SR eine hochkonservierte Region. Innerhalb einer Spezies weist die LBD eine Homologie von 80-97% auf und ermöglicht daher eine Hormonspezifische Aktivierung (28).

Die LBD besteht aus 12 α -Helices und einer β -Faltblattstruktur (27), die 3 antiparallele Schichten bilden.

Die Bindungstasche für Aldosteron besteht aus 23 AS, die auf den Helices 3, 5-7, 11 und 12 liegen. 7 AS davon sind MR-spezifisch (31).

Die Region allerdings, die letztlich für die Spezifität der Ligandenbindung verantwortlich ist, also für die Bindung von Aldosteron, liegt in der Region 820-844 und somit außerhalb der Ligandenbindungstasche auf der Oberfläche des MR (14).

Man vermutet, dass diese Region aus der Distanz heraus die Konformation des MR z.B. über Hitzeschockproteine beeinflusst.

In Abwesenheit eines Liganden bindet die LBD zahlreiche Chaperone wie heat shock protein (hsp) 90 und 70 und Immunophiline (32). Bei Ligandenbindung lösen sich die Chaperone ab und geben das nukleäre Lokalisationssignal NLS2 frei, das letztlich dafür verantwortlich ist, dass der MR an den Ort seiner Bestimmung, den Zellkern, abwandern kann.

Die LBD des MR weist außerdem die Aktivierungsdomäne AF2 auf, die bei Bindung des Liganden aktiv wird. In der LBD des MR liegen weiterhin Regionen, die die Heterodimerisierung mit dem GR ermöglichen (27).

1.1.3 MR-Selektivität

Der MR wird nicht nur durch Aldosteron aktiviert, sondern auch durch Glukokortikoide; diese binden an den MR mit einer ähnlichen Affinität wie Aldosteron. Eine Übersicht über Affinitäten verschiedener Steroidhormone vermitteln Abb. 4 (30) und 5 (33).

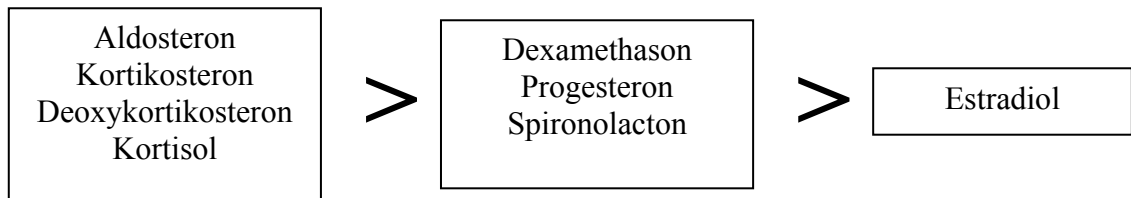


Abb. 4: Darstellung der Affinität verschiedener Liganden zum hMR

Die Affinität der Glukokortikoide zum MR ist sogar größer als die zum „eigenen“ Rezeptor GR (34). Außerdem kommen sie in 100-1000fach höherer Konzentration im Plasma vor als Aldosteron. Auch unter Berücksichtigung der höheren Plasmaeiweißbindung der Glukokortikoide muss man sich berechtigterweise die Frage stellen, warum der MR nicht dauerhaft von Glukokortikoiden besetzt ist anstelle von Aldosteron (30;35;36).

	<i>Steroide mit OH-Gruppe an C21</i> (Aldo, Glukokortikoide)	<i>Steroide mit Ketogruppe an C17</i> (Estradiol, Testosteron)	<i>C21-Steroide ohne weitere Modifikation</i> (Progesteron)
Formen der Aktivierung	AGONIST	Keine Aktivierung	ANTAGONIST (Bindung, keine Aktivierung)

Abb. 5: Wirkung unterschiedlicher Steroidgruppen am hMR

Endgültig geklärt ist diese Frage noch nicht, aber es bieten sich verschiedene Erklärungsansätze an:

So ist das Enzym 11-β-HSD2 (11-β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase) in der Lage, Cortisol in das inaktive Cortison umzuwandeln und so den MR vor Cortisol-induzierter Aktivierung zu schützen (37;38). Bei einem Defekt der 11-β-HSD kommt

es zu einer schweren Hypertonie als Folge einer unkontrollierten MR-Aktivität (Syndrom des apparenten Mineralokortikoidexzesses) (39).

Allerdings wird die 11- β -HSD2 nur in den klassischen epithelialen Aldosteron-Zielgeweben wie Niere oder Kolon exprimiert, so dass die Frage ungeklärt bleibt, wie die MR-Aktivierung in Herz oder Gehirn reguliert wird, wo zwar der MR, aber nicht die 11- β -HSD2 (bzw. nur in sehr geringen Mengen) vorkommt (37;40). In Blutgefäßen wiederum werden sowohl MR als auch 11- β -HSD2 exprimiert (41).

Seit einigen Jahren wird auch eine Redox-abhängige Regulierung der MR-Aktivität postuliert (42), s. Kap. 1.2.4. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Aldosteron viel langsamer vom MR abdissoziiert als Kortisol und so in der Lage ist, den MR länger in einem aktiven Zustand zu halten (27).

Weiterhin spielen auch die Gewebeverteilung des MR und seiner spezifischen Koregulatoren eine Rolle bei der MR-vermittelten Aldosteronsensitivität bestimmter Zelltypen (27).

Als Beispiel für die Empfindlichkeit der MR-Spezifität gegenüber auch kleinster Modifikationen seien Ergebnisse von Marissal-Arvy genannt:

In einem speziellen Rattenstamm (Brown Norway rat) wurde eine Tyrosinsubstitution im MR (anstelle eines Cysteins) identifiziert; wird dieses Tyrosin im Rahmen posttranslationaler Modifikation phosphoryliert, so folgt daraus eine vermehrte MR-Transaktivierung und teilweise Aktivierbarkeit des MR durch Progesteron (43).

Alle „response elements“ des MRs sind GREs, d.h. Glucocorticoid-response-elements, was die Frage nach MR-spezifischen Proteinen erschwert. Allerdings konnte unlängst gezeigt werden, dass der menschliche EGF-Rezeptor MR-selektiv ist, was in etwa der Existenz eines funktionellen Mineralokortikoid-response-elements entspricht (44).

Die molekularen Mechanismen, die die Rezeptorspezifität des MR beeinflussen, sind mehr als vielfältig, finden auf mehreren Ebenen statt (Prärezeptor, Rezeptor- und Postrezeptorebene) (27) und sind in ihrer Gesamtheit noch lange nicht geklärt.

1.1.4 Funktionsweise: MR/Aldosteron

Im Ruhezustand (d.h. ohne Bindung eines Liganden) befindet sich der MR im Zytoplasma als Teil eines löslichen hetero-oligomeren Komplexes, der neben dem

MR auch noch Hsp90, Hsp70 und andere Chaperone enthält (28;45). Hsp90 verhindert hierbei die ligandenunabhängige Aktivierung des MR.

Nach Bindung von Aldosteron kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb der LBD (Ligandenbindungsdomäne) des MR; dies führt zu einer Abdissoziation der Chaperon-Proteine, zu einer Dimerisierung des Rezeptors und zu seiner nukleären Translokation (45). Für die nukleäre Translokation sind nukleäre Lokalisationssignale (NLS) innerhalb der Rezeptorstruktur notwendig, von denen bisher 3 beschrieben wurden; je eine befindet sich in der NTD, in der LBD und im C-terminalen Ende der DBD (28).

Im Zellkern bindet der Rezeptor-Hormon-Komplex an bestimmte DNA-Sequenzen, genannt HREs (hormon response element). Im Fall des MR trägt diese HRE den Namen GRE (glucocorticoid response element). Sowohl MR als auch GR binden letztlich an GRE und üben ihre klassische Wirkung über die Beeinflussung der Transkriptionsaktivität bestimmter DNA-Abschnitte und somit der Proteinbiosynthese aus (26).

Der MR entfaltet also seine Wirkung als Homodimer (MR/MR) und als Heterodimer (MR/GR) (46). Für das Heterodimer MR/GR wurden sowohl verstärkende als auch abschwächende Wirkungen auf ihre HREs beschrieben. Diese klassische genomische Wirkungsweise findet v.a. in den epithelialen Geweben Anwendung (Niere, Kolon, Speicheldrüsen) (47).

1.1.5 Wirkungen des MR

Lange Zeit war die soeben beschriebene klassische Wirkung des MR, d.h. die Regulation der Proteinbiosynthese (die sogenannte 'langsame' genomische Wirkung des MR) die einzig bekannte Wirkweise des MRs und daran gekoppelt die von Aldosteron. Ziel und Zweck dieser genomischen Wirkung waren Kontrolle des Salz- und Wasserhaushalts in Niere und Kolon.

Seit den 90ern ist nun bekannt, dass Aldosteron/der MR noch eine ganze Reihe anderer biologischer Mechanismen/Organfunktionen beeinflussen und zudem nicht nur genomische, sondern auch nicht-genotrope Effekte hervorrufen (1).

1.1.5.1 Epitheliale genomische Effekte

Die klassische Wirkweise des MR auf genomischer Basis ist unter 1.1.4 bereits beschrieben worden.

Die klassischen Zielgewebe des MR sind die Epithelien der Niere, des Kolons, der Speichel- und der Schweißdrüsen (aber auch in anderen epithelialen Geweben konnte der MR nachgewiesen werden, z.B. in Lunge, Mamma, Dünndarm) (48-50).

In diesen Geweben vermittelt Aldosteron mit Hilfe des MR die zelluläre Natrium-Aufnahme, der Wasser nachfolgt, und reguliert somit den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers.

Zwei Proteine spielen dabei auf zellulärer Ebene eine zentrale Rolle: der ENaC (epithelialer Natrium-Kanal) und die basolateral angesiedelte $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Aufrechterhaltung des zellulären Ionengradienten) (14).

Außerdem soll Aldosteron auch die Aktivität des luminalen Na^+/H^+ -Austauschers im Kolon und des luminalen thiazidsensitiven Na^+/Cl^- -Kotransporters erhöhen (47).

Aldosteron kann auf die Aktivität des ENaC und der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ auf zweierlei Weise einwirken: durch Induktion von Signalmolekülen, die die Aktivität/Expression bereits vorhandener Pumpen/Kanäle beeinflussen (frühe Phase der Aldosteron-Wirkung, ca. 1-6 h nach Aldo-Gabe) und durch direkte Beeinflussung der Biosynthese von Untereinheiten der benötigten Pumpen/Kanäle (späte Phase, > 6h) (47).

Folgende Proteine, die durch Aldosteron MR-vermittelt induziert werden können, wurden bisher identifiziert:

ENaC:

Der ENaC (epithelialer Natriumkanal) befindet sich auf der apikalen Zellseite, ermöglicht den Na^+ -Einstrom in die Zelle und besteht aus einer α -, β - und γ -Untereinheit.

Bei der Regulierung des ENaC spielt die Ubiquitin-Ligase Nedd4-2 eine wichtige Rolle: Nedd4-2 interagiert mit dem C-Terminus der β - oder γ -Untereinheit, was zum Abbau in Proteasomen führt. Außerdem wird die Aktivität des ENaC auch durch extrazelluläre Serinproteasen und durch Modifizierungen wie Methylierung und Phosphorylierung beeinflusst. Die ENaC-Untereinheiten sind Aldosteron-abhängige Gene: in der Niere wird die Synthese der α -Untereinheit des ENaC durch Aldosteron induziert, im Kolon sind dies die β - und die γ - Untereinheit (14).

Na⁺-K⁺-ATPase:

Die Na⁺-K⁺-ATPase ist in der Niere ubiquitär auf der basolateralen Zellseite zu finden. Unter ATP-Verbrauch sorgt sie für den Transport von 3 Na⁺-Ionen nach extrazellulär und gleichzeitig für den Transport von 2 K⁺-Ionen nach intrazellulär.

Dies dient dazu, den elektrochemischen Gradienten für Natrium entlang der Zellmembran aufrechtzuerhalten und stellt letztlich die Grundlage für die Funktionsfähigkeit sekundär aktiver Transportmechanismen dar (51).

Die Na⁺-K⁺-ATPase besteht aus 2 Untereinheiten, die größere α -Untereinheit, die katalytisch aktive, und eine kleinere β -Untereinheit, die für den Transport des Na⁺-K⁺-ATPase-Komplexes zur Zellmembran verantwortlich ist (52).

In manchen Geweben (v.a. in der Niere) enthält die Pumpe noch eine dritte optionale Untereinheit, die γ -Untereinheit, die die Pumpaktivität moduliert, indem sie die Affinität der Pumpe für intrazelluläres Natrium beeinflusst (52).

Die Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase wird durch die Verfügbarkeit von ATP und durch die intrazelluläre Kalium- und Magnesium-Konzentration beeinflusst (51).

Aldosteron stimuliert in der frühen Phase die Na⁺-K⁺-ATPase-Aktivität durch Mechanismen wie die Rekrutierung von intrazellulären Pumpen (53).

In seiner späten Phase (bis zu 48 h) bewirkt Aldosteron MR-vermittelt eine Erhöhung der Expression der α - und auch der β -Untereinheit der Na⁺-K⁺-ATPase und damit eine verstärkte Aktivierung dieser Ionenpumpe (54).

Channel-inducing factor (CHIF):

1-2 Stunden nach Aldosteron-Gabe steigen die intrazellulären CHIF-mRNA-Level.

CHIF erhöht die Affinität der Na⁺-K⁺-ATPase für Natrium (14;55).

Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase (sgk):

Bei der sgk handelt es sich um eine Serin-Threonin-Kinase, deren Expression 30 Minuten nach Aldosteron-Gabe in Niere und Kolon, den klassischen Aldosteron-Zielgeweben, hochreguliert wird.

Die sgk phosphoryliert Nedd4-2 und hemmt es dadurch; da Nedd4-2 den Abbau von ENaC bewirkt, führt die sgk letztlich durch Inhibierung von Nedd4-2 zu einer Verlängerung der Halbwertszeit des ENaC (14). Sgk erhöht aber nicht nur die Oberflächenexpression von ENaC, sondern auch die der Na⁺-K⁺-ATPase (56).

K-ras2:

K-ras2 ist ein G-Protein, das eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion spielt. K-ras2 kodiert 2 unterschiedliche Proteine, K-ras2A und K-ras2B, die Spleißvarianten desselben Gens darstellen (57), und wird durch Aldosteron induziert (57).

Es konnte gezeigt werden, dass K-ras2 in zweierlei Hinsicht die Aktivität des ENaC in Niere und Kolon beeinflusst: es vermindert die Anzahl der Natrium-Kanäle an der Zelloberfläche, gleichzeitig erhöht es die Aktivität der ENaCs, die noch an der Zelloberfläche exprimiert sind (58).

Glucocorticoid-induced leucine zipper protein (GILZ):

GILZ war zuallererst bekannt als Glukokortikoid-responsives Gen in T-Zellen, wo es die In-Gang-Setzung des MAP-Kinase-Signalwegs verhindert (14). In der Niere stimuliert GILZ den ENaC-vermittelten Na⁺-Transport, indem es den ERK-Signalweg hemmt (extracellular signal-regulated kinase) (59).

Andere:

Es gibt weitere Gene, deren Expression in Niere und Kolon durch Aldosteron-Gabe gesteigert werden kann. Die biologische Funktion im Zusammenhang mit Aldosteron ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Dazu gehören beispielsweise NDRG2 (N-myc downstream regulated gene2), Endothelin-1 (ET-1) und der Plasminogen Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) (28).

1.1.5.2 Nicht-epitheliale Effekte von Aldosteron/MR

Der MR wird auch in nicht-epithelialen Organsystemen exprimiert, v.a. im Herzen (60;61), in Gefäßen (62) und ZNS (63). Pathologische MR-Aktivierung kann zu Endorganschäden führen, v.a. im Herz, in Gefäßen und in der Niere, und ist beteiligt an der Entstehung von Herzinsuffizienz und Schlaganfällen (2;3;42;64). Chronisch erhöhte Plasma-Aldosteron-Level (z.B. im Rahmen von Nebennierenadenomen) führen - unabhängig von der mit dem Hyperaldosteronismus assoziierten Blutdruckerhöhung - zu folgenden renalen und kardiovaskulären Komplikationen: endotheliale Dysfunktion (65), Linksherzhypertrophie, Schlaganfall, Proteinurie und Niereninsuffizienz (66).

Die Aldosteron-Spiegel im Plasma müssen aber nicht exorbitant erhöht sein (wie es der Fall bei primärem Hyperaldosteronismus ist), um solche pathologischen Effekte

hervorzurufen: in Patienten mit essentieller Hypertonie konnte eine positive Korrelation zwischen Plasma-Aldosteron-Konzentrationen und der Entstehung einer Linksherzhypertrophie nachgewiesen werden; dabei überschritt die Plasma-Aldosteron-Konzentration nur unwesentlich die zulässige physiologische obere Grenze (20.2 ± 2.3 ng/dl bei einem Referenzbereich von 1-20 ng/dl) (67).

Am deutlichsten veranschaulicht die RALES-Studie (Randomized Aldactone Evaluation Study) von 1999 die pathophysiologische Bedeutung der Aldosteron/MR-Wirkung: bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz konnte durch die Gabe von Spironolacton, einem Aldosteron-Antagonisten, die Mortalität um 30% und die Hospitalisierungsrate um 35% gesenkt werden (5). Die EPHEsus-Studie von 2003 bestätigte diese Ergebnisse für den selektiven Aldosteron-Antagonisten Eplerenon (6).

Die Grundlagen dieser pathologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene bilden Inflammation, Kollagenbildung sowie Induktion von Fibrose und Nekrose (2;3;42).

In Experimenten konnte durch die Gabe von Aldosteron bzw. durch pharmakologische Aldosteron-Blockade Einfluss genommen werden auf das Wachstum von Fibro- und Myofibroblasten sowie auf Kollagenablagerung und Fibrosierung in Niere, Herz und in den Blutgefäßen (3;10;68;69).

Histologisch konnten in Herz- und Nierengefäßen eine panarterielle Entzündung, segmentale oder umfassende fibrinoide Nekrosen der Media sowie Herde von ischämischen und nekrotischen Schäden im Myokard nachgewiesen werden (68).

Verschiedene Signalwege scheinen an diesen pathologischen Prozessen (s. Abb. 6) beteiligt zu sein (3):

<i>Signalweg</i>	<i>Aldo-Effekt</i>	<i>Pathophysiologische Wirkung</i>
PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1)	↑	<ul style="list-style-type: none"> • Gesteigerter Umsatz der Extrazellulärmatrix • Aktivierung von Wachstumsfaktoren
TGF-β	↑	<ul style="list-style-type: none"> • Kollagensynthese und -ablagerung ↑ • Fibroblastenproliferation ↑

Radikale	↑	<ul style="list-style-type: none"> • Proteindenaturierung • Zellmembranschäden
NO	↓	<ul style="list-style-type: none"> • Hypertonie • Fibroblastenproliferation ↑

Abb. 6: Beteiligte Signalwege der Mineralokortikoid-induzierten Gefäßschädigung

Aldosteron ist außerdem in der Lage, die Katecholaminaufnahme in glatte Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten zu vermindern, was die Entstehung kardialer Herzrhythmusstörungen erklären könnte (3). Weiterhin kann Aldosteron die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen induzieren und so zu Arteriosklerose führen (70). Zudem verändert Aldosteron das Volumen von Gefäßendothelzellen und führt aller Wahrscheinlichkeit nach hierüber zu einer Abnahme der NO-Produktion in den Endothelzellen (und somit zu Vasokonstriktion) (71).

Der Mechanismus, der schließlich zu all diesen Veränderungen führt, ist noch nicht geklärt. Es gibt aber Hinweise darauf, dass nicht Aldosteron per se, sondern teilweise unangemessene MR-Aktivierung für all diese Inflammationsprozesse verantwortlich ist. Diese unangemessene MR-Aktivierung kann z.B. durch Aldosteron im Zusammenhang mit einem veränderten Salzhaushalt oder durch Glukokortikoide nach erfolgtem Gewebeschaden stattfinden (72).

Im ZNS findet man die höchsten zerebralen Konzentrationen an MR in den Körnerzellen des Kleinhirns, außerdem in Hippocampus und Hypothalamus. Hingegen sind Septum, Striatum und Mesenzephalon MR-frei (73).

Der MR spielt im ZNS v.a. eine Rolle bei der Blutdruckregulation (74): Gabe von geringen Dosen Aldosteron in die Ventrikel von Ratten führte zu Bluthochdruck (keine Wirkung bei systemischer Gabe derselben Aldosteron-Menge) (75). Gleichzeitige Gabe eines MR-Antagonisten verhinderte die Bluthochdruckbildung, was für eine Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung in nicht-epithelalem Gewebe spricht (76). Außerdem führt zentrale MR-Aktivierung zu einer Zunahme von Salzappetit und Durst und steuert hierüber ebenfalls den Blutdruck (77).

Darüberhinaus moduliert der MR auch Kognitions- und Verhaltensprozesse (78), Stressreaktionen im Gehirn (79) sowie die Hormonausschüttung im Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (80). Mehrere Studien belegen zudem die anti-apoptotische Wirkung des MR im Hippocampus (28).

1.1.5.3 Nicht-genotrope Effekte von Aldosteron

Klassischerweise übt Aldosteron seine Wirkungen nach Bindung an den MR über die Beeinflussung der Proteinbiosynthese aus. Es sind aber auch nicht-klassische, sog. alternative Aldosteron-Wirkungen beschrieben.

Diese alternativen Wirkungen zeichnen sich durch folgende Charakteristika aus:

Sie treten schnell, d.h. innerhalb weniger Minuten nach Aldosteron-Gabe auf; außerdem sind sie unempfindlich gegenüber Hemmung der Transkription (durch Aktinomycin) und der Proteinsynthese (durch Cycloheximid) (81;82).

Zu diesen schnellen Effekten gehören die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und des intrazellulären pH-Wertes durch akute Aktivierung des Na^+/H^+ -Austauschers (83-86), Erhöhung der *second messenger* 1,4,5-Inositoltriphosphat, Diacylglycerol, Proteinkinase C (7;8;82;87) sowie Phosphorylierung von ERK1/2 (88) und JNK1/2 (89). In MDCK-Zellen (Zell-Linie abgeleitet von Hunde-Nieren) führte Aldosteron zudem zu einer Änderung der K^+ -Leitfähigkeit der Zellmembran (90).

In kardialen Myozyten führt Aldosteron zu einer Erhöhung des $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransportes und zugleich zu einer Abnahme der Na^+/K^+ -Pumpaktivität. Letztere ist $\text{PKC}\epsilon$ -vermittelt (91).

Es stellt sich allerdings noch die Frage, ob und inwieweit der MR bei der Vermittlung der schnellen Aldosteron-Wirkungen eine Rolle spielt. Kürzlich wurde gezeigt, dass es schnelle Aldosteron-Wirkungen gibt, die MR-unabhängig ablaufen (z.B. intrazelluläre Calciumerhöhung) und wiederum andere, die den MR benötigen (z.B. ERK1/2- und JNK1/2-Phosphorylierung) (89).

Allerdings ist man sich noch uneins über die „Art“ des hierbei benötigten MR, da die Reaktion der schnellen Aldo-Effekte auf MR-Antagonisten sehr unterschiedlich ausfällt: der Großteil der nicht-genotropen Aldosteron-Effekte lässt sich nicht durch Spironolacton, den Prototyp unter den MR-Antagonisten, beeinflussen, während besagte Effekte gleichzeitig z.B. sehr sensibel auf Eplerenon oder RU28318 reagieren (92).

Davon ausgehend existieren zwei Hypothesen: Es könnte sich bei diesem an den schnellen Aldo-Wirkungen beteiligten MR um den „klassischen“ MR handeln (93) oder um einen noch nicht identifizierten, nicht-klassischen MR, der in der

Zellmembran lokalisiert ist und von dort aus die Aldosteron-Effekte vermittelt (13;94).

Für das Steroidhormon Progesteron wurde beispielsweise ein solcher Membranrezeptor bereits charakterisiert (95).

Desweiteren wurden Interaktionen mit dem adrenergen System (96), Angiotensin II, Vasopressin und dem EGF-Rezeptor (EGFR) beschrieben (97;98). Eine solche Interaktion soll am Beispiel des EGFR kurz erläutert werden: EGF (epidermal growth factor) spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und -differenzierung und beeinflusst auch den epithelialen Salztransport (Zelltyp-abhängig vermehrter oder verminderter Salztransport). Zum einen wurde gezeigt, dass Aldosteron via MR die EGFR-Expression steigern kann (99). Zum anderen ist Aldosteron in der Lage, den EGF-Rezeptor für EGF zu sensitivieren, und führt so zu einer Potenzierung der EGF-Wirkung (97).

Der Cross-Talk zwischen Aldosteron und EGFR scheint die Bildung von Extrazellulär-Matrix zu fördern, indem Aldosteron zwar nicht per se pathologische Kollagenbildung initiiert, aber das Gewebe für Stimuli wie Wachstumsfaktoren sensitiviert (98). Fibrotische Wirkungen des Aldosterons (s. 1.1.5.2) lassen sich damit zumindest teilweise erklären.

Es wurde außerdem gezeigt, dass nicht-genotrope und genotrope Effekte des Aldosterons interagieren: So haben die EGFR-vermittelten nicht-genotropen Aldosteron-Effekte einen steigernden Einfluss auf die genomischen Wirkungen des MR. Die AB-Domäne des MR scheint eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen genomischen und nicht-genotropen Aldosteron-Wirkungen zu spielen (98). Eine solche Interaktion zwischen genomischen und nicht-genotropen Aldosteron-Effekten wurde auch für den PKC α -Signalweg (100) und für Calcium (101) vorgeschlagen.

1.2. Ausgewählte sekundäre Botenstoffe, die in Interaktion mit dem MR treten

Die Effekte, die Aldosteron/MR vermitteln können, sind zahlreich – ebenso die Anzahl der Moleküle/Botenstoffe, deren Aktivität durch Aldo/MR reguliert wird bzw. die mit dem MR interagieren.

Die Interaktionen mit ein paar ausgewählten sekundären Botenstoffen soll im Folgenden dargestellt werden:

1.2.1 Calcium

Ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration 1-2 min nach akuter Aldosteron-Gabe gehört zu den schnellen nicht-genotropen Aldosteron-Effekten und wurde für eine Vielzahl von Zelltypen beschrieben, darunter Epithel, Endothel und glatte Gefäßmuskelzellen (83;84;102).

Die intrazelluläre Calcium-Erhöhung bei akuter Aldo-Gabe ist auch essentiell für die intrazelluläre pH-Erhöhung, die ebenfalls zu den nicht-genotropen Aldosteron-Effekten gehört (86).

In Nierenzellen (MDCK-Zellen) konnte übrigens ein interessanter Mechanismus aufgezeigt werden: der intrazelluläre Calcium-Anstieg, wie er nach Aldosteron-Gabe akut auftritt, führte in den genannten Zellen zu einer Kontraktion der Kernporen. Diese Kontraktionen könnten dabei behilflich sein, den Aldosteron-aktivierten MR vom Zytoplasma in den Nukleus zu transportieren (101), und könnten so einen Verbindungsweg zwischen den schnellen, nicht-genotropen und den klassischen Aldosteron-Wirkungen darstellen.

1.2.2 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C steuert durch Übertragung eines Phosphatrestes auf Serin- und Threoningruppen die Aktivität nachgeschalteter Proteine/Enzyme.

Es existieren mehrere PKC-Isoformen, die man in 3 Subgruppen einordnen kann (103;104):

- cPKC (conventional): cPKCs werden durch Ca^{2+} - und Diacylglycerol (DAG) aktiviert. Hierzu gehören PKC α , PKC β , PKC γ .
- nPKC (novel): nPKCs werden durch DAG aktiviert und sind Ca^{2+} -unabhängig. Verteter sind PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ .
- aPKC (atypical): zu den aPKCs gehören PKC ζ und PKC λ ; aPKCs sind DAG- und Ca^{2+} -unabhängig, können aber durch Phosphatidylserin aktiviert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die PKC ϵ , welche zu den nPKCs gehört, eine zentrale Rolle spielt beim Schutz des Myokards vor ischämischen Schäden sowie in

der postnatalen Entwicklung des Myokards (105). Eine Hemmung der PKC ϵ kann sogar eine tödlich verlaufende Kardiomyopathie auslösen (106). Diese kardioprotektive Funktion der PKC ϵ kann aber auch ins Gegenteil umschlagen: in Experimenten an Mäusen führten sehr hohe Spiegel an aktivierter PKC ϵ zu signifikanter Myokardhypertrophie (107). Dies lässt sich möglicherweise folgendermaßen erklären: Die Aldosteron-induzierte Steigerung der Aktivität des Na⁺/K⁺-2Cl⁻-Kotransporters und gleichzeitige Minderung der Aktivität der Na⁺-K⁺-Pumpe ist PKC ϵ -abhängig. PKC ϵ -abhängige Reduzierung der Na⁺-K⁺-Pump-Aktivität könnte die intrazelluläre Calcium-Konzentration anheben und so zur Herzhypertrophie führen (91).

Gleichzeitig gehört die PKC auch zu den sekundären Botenstoffen, deren Aktivitätssteigerung zu den nicht-genotropen Aldosteron-Effekten gehört (7).

Vor Kurzem wurde vorgeschlagen, dass die Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung teilweise auf PKC α -Aktivierung (Vertreterin der cPKCs) beruht (100). Allerdings konnte dies bisher nicht bestätigt werden.

Für eine andere Proteinkinase, nämlich Proteinkinase A (PKA), konnte bereits gezeigt werden, dass sie sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Aldosteron für die Transaktivierungsaktivität des MRs nötig ist (108).

1.2.3 PI-3-Kinase

PI-3-Kinasen (Phosphoinositid-3-Kinasen) sind Enzyme, die die D3-Position des Membranlipids Phosphatidylinositol phosphorylieren. Die dabei entstehenden Produkte werden als D-3-phosphorylierte Phosphoinositide bezeichnet (109;110). Zahlreiche biochemische Prozesse werden durch die PI-3-Kinase mitreguliert, darunter Zellproliferation (111) und viele Membrantransportprozesse (112).

Die PI-3-Kinase spielt eine wichtige Rolle bei Aldosteron- und Insulin-vermittelten intrazellulären Vorgängen. Die PI-3-Kinase gehört allerdings nicht zu den direkt von Aldosteron-induzierten Proteinen, ihre Aktivität wird aber in renalen Epithelzellen sowohl durch Aldosteron als auch durch Insulin gesteigert (47).

Sowohl schnelle nicht-genotrope als auch langsame genomische Aldosteron-Wirkungen werden von der PI-3-Kinase beeinflusst; man geht davon aus, dass die PI-3-Kinase einen protektiven oder stimulierenden Einfluss auf die ENaC-Level in

der apikalen Membran ausübt und somit an der Aldosteron-vermittelten Na^+ -Aufnahme in die Epithelzellen hinein beteiligt ist (47).

Zu den PI-3-abhängigen biochemischen Prozessen gehören nicht nur Aldosteron-abhängige Signalwege, sondern vor allem auch Insulin-induzierte Prozesse: so konnte gezeigt werden, dass die PI-3-Kinase für die Insulin-getriggerte Glucose-Aufnahme und DNA-Synthese benötigt wird (110).

Auch an der Vasopressin-vermittelten Na^+ -Aufnahme scheint die PI-3-Kinase beteiligt zu sein (113).

Die PI-3-Kinase spielt also eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, die durch Aldosteron, Insulin und Vasopressin ausgelöst wird; gleichzeitig üben alle drei genannten Hormone Einfluss auf die Na^+ -Aufnahme in die Zelle aus.

Daher liegt die Vermutung nahe, dass die PI-3-Kinase der Knotenpunkt sein könnte, an dem die Signalwege von Aldosteron, Insulin und Vasopressin konvergieren, um beispielsweise die Regulation des ENaC oder der Na^+/K^+ -ATPase zu koordinieren (47).

1.2.4 ROS

Im Rahmen der in einer Zelle stattfindenden Stoffwechselprozesse und der Regulierung des intrazellulären Redoxhaushaltes kommt es am laufenden Band zur Bildung von Radikalen. Die dabei entstehende Menge an Radikalen wird unter dem Begriff ROS (reactive oxygen species) zusammengefasst. Die wichtigsten Vertreter der ROS sind hierbei Superoxid O_2^- , Wasserstoffperoxid H_2O_2 und Hydroxylradikale OH^\cdot .

ROS gehören zu den Aldosteron-induzierten schnellen Botenstoffen (3;114).

Es gibt nun in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf, dass auch ROS eine Rolle bei der Regulierung der Transaktivierungsaktivität des MR spielen (42;72;114;115).

Folgende Überlegungen und Ergebnisse lassen diese These naheliegend erscheinen:

Erstens: Es konnte bereits gezeigt werden, dass periphere Monozyten und Gefäßmuskelzellen durch Aldosteron dazu stimuliert werden, vermehrt Radikale zu bilden (114). Gleichzeitig wird auch eine noch nicht ganz geklärte Beeinflussung der MR-Aktivität durch ROS in verschiedenen Arbeiten beschrieben (114).

So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Zunahme von Oxidantien in einer Zelle zur Abnahme der MR-Proteinmenge führt; dies soll vor allem auf einer Änderung der

posttranslationalen Modifikation des MR und auf einem Fehler bei der Elongation/Termination während der Rezeptor-Translation beruhen (115).

Zweitens: Es ist schon längere Zeit bekannt, dass Radikale in subtoxischen Dosen als Signalmoleküle fungieren können (116). Verschiedene Radikale, auch H_2O_2 , sind in der Lage, die intrazelluläre Calcium-Konzentration zu erhöhen (300 μM H_2O_2 führen zu einer solchen Calcium-Erhöhung) (117) und in T-Lymphozyten die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen zu stimulieren, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (118).

Auch die Induktion/Aktivierung mancher Transkriptionsfaktoren wie NF κ B und AP-1 wird durch ROS und den zellulären Redox-Zustand reguliert (119;120).

Es wurde auch schon mehrfach die Vermutung geäußert, dass Radikale von bestimmten Hormonen und Botenstoffen als sekundäre Botenstoffe benutzt werden. So führen z.B. Insulin und der platelet-derived growth factor zu einer intrazellulären H_2O_2 -Erhöhung und benutzen H_2O_2 zur Signaltransduktion (121;122).

Es ist daher nicht abwegig, zu vermuten, dass auch der Aldosteron/MR-Signalweg H_2O_2 /ROS als sekundären Botenstoff benutzt.

Drittens: J.W. Funder stellte unlängst eine weitere Hypothese auf, was den Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Redoxhaushalt und der MR-Aktivierung anbelangt:

Wie unter 1.1.3 dargelegt, verhindert die 11- β -HSD2 in klassischen MR-Zielgeweben die Bindung des mengenmäßig überwiegenden Kortisols an den MR, indem es die Umwandlung des aktiven Kortisols ins inaktive Kortison katalysiert. Ungeklärt ist, wie die MR-Ligandenbindung in nicht-klassischen MR-Zielgeweben wie Herz oder Hirn geregelt ist, wo zwar der MR, die 11- β -HSD2 nicht oder nur in geringen Mengen exprimiert ist (37;40).

Bei der Umwandlung von Kortisol (Hydroxylgruppe $-OH$ am C11) in Kortison (Ketogruppe $=O$ am C11) wird NAD^+ als Kofaktor verbraucht (wobei $NADH/H^+$ entsteht) (s. Abb. 7).

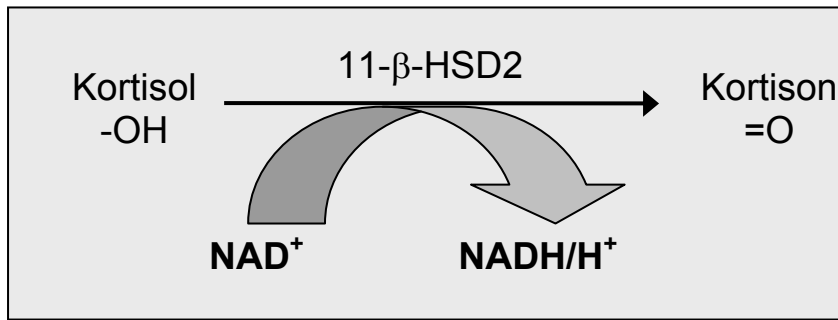


Abb. 7:
Umwandlung von
Kortisol in Kortison
unter NAD⁺-Verbrauch,
katalysiert durch
11-β-HSD2

Laut Funder gibt es bei dieser Überlegung nur einen einzigen Haken: 11-β-HSD2 ist selbst in den klassischen MR-Zielgeweben nicht in der Lage, das gesamte Kortisol zu eliminieren.

Durch die 11-βHSD2 können Schätzungen zufolge nur 90% des anwesenden Kortisols eliminiert werden, d.h. auch bei erfolgreicher Aktivität der 11-β-HSD2 beträgt die intrazelluläre Kortisolkonzentration ca. das 10-fache der Aldosteronkonzentration (42). Laut Funder müssen also in den meisten Geweben auch reichlich Glukokortikoid-MR-Komplexe vorliegen, die allerdings inaktiv sind (42;72).

Außerdem besitzt auch Kortison eine Gewebe-spezifische Affinität zum MR (z.B. geringe Affinität zum MR in der Niere, sehr hohe Affinität zum MR im Hippocampus) (123).

Funder postuliert nun, dass die Aktivierung dieser Kortisol/MR-, Kortison/MR- und Aldosteron/MR-Komplexe durch den zellulären Redoxhaushalt mitreguliert wird (13;42;72).

Die 11-β-HSD2 spielt eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des MR; wichtiges Kosubstrat der 11-β-HSD2 ist aber NAD⁺, welches zugleich als Indikator für den zellulären Redoxhaushalt fungiert. Diese Überlegungen legen nahe, dass eine Änderung des Redoxhaushaltes, z.B. durch Zugabe von Radikalen, durchaus die Funktion des Aldosteron/MR-Signaltransduktionsweges beeinflussen könnte – und zwar vermittelt über NAD⁺ und die daraus resultierende Modulation der Aktivität der 11-β-HSD2 (124).

1.3. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Ca²⁺, der PKC, der PI-3-Kinase und von ROS auf die genomische Aldosteron-Wirkung zu untersuchen, d.h. auf die Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Für alle Experimente wurden HEK293-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells), die sich funktionell und morphologisch fibroblastenähnlich verhalten.

Sie besitzen selbst keinen nachweisbaren Mineralokortikoidrezeptor (89) und keine 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (45), was sie als biologisches Modell für unsere Versuche besonders interessant macht: man kann durch Transfektion die Zellen genau so manipulieren, wie man es selbst für sinnvoll hält und vermeidet Interferenzen durch Aktivitäten eines endogenen MR bzw. einer endogenen 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.

Die Zellen wurden auf Petrischalen (100x15 mm, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM/HamF12⁺ (Biochrom AG, Seromed ®) benutzt, dem 10 % FCS zugesetzt war.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ aufbewahrt und zweimal in der Woche subkultiviert. Der optimale Zeitpunkt zum Splitten war dann erreicht, wenn das Wachstum der Zellen konfluent war, d.h. wenn die Zellen flächendeckend den Boden der Petrischale zugewuchert hatten.

Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen wurden anschließend für 3-5 Minuten in 0,2 g/l EDTA-haltiger, Phosphat-gepufferter Ringerlösung (PBS) inkubiert.

PBS enthält in g/l: NaCl 8, KCl 0.2, Na₂HPO₄ 1.15, KH₂PO₄ 0.2.

Nach Entfernen der EDTA-Lösung wurden die Zellen daraufhin für weitere 5-8 Minuten in Trypsin-haltigem (0,25 g/l) EDTA-PBS inkubiert, damit sich die Zellen endgültig vom Boden der Petrischale lösen konnten.

Die Wirkung des Trypsins wurde durch die Zugabe von 10 ml Kulturmedium aufgehoben.

10 % der so abgelösten Zellen wurden auf einer neuen Petrischale als neue Zellpassage angesät, die restlichen Zellen wurden für Versuche verwendet.

Die jüngste für Experimente benutzte Zellpassage war Passage 16, die älteste 57.

2.2 Messung intrazellulärer Calciumkonzentrationen

Um die intrazelluläre Konzentration an freiem Calcium $[Ca^{2+}]_i$ zu messen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (Molecular Probes, Leyden, Niederlande) benutzt (125;126).

Diese Messung beruht auf folgendem Prinzip: Die Fluoreszenzintensität von Fura-2 ist abhängig von der freien Calcium-Konzentration. Die mit Fura-2 beladenen Zellen werden bei 334 nm und 380 nm Wellenlänge angeregt. Das emittierte Licht wird bei 510 nm aufgenommen. Bei einer Anregungswellenlänge von 334 nm nimmt die Fluoreszenzintensität mit steigender Calcium-Konzentration zu, während sie bei 380 nm abfällt. Über das Verhältnis 334/380 nm kann nun die intrazelluläre Calcium-Konzentration unabhängig von der Farbstoffkonzentration bestimmt werden.

Dabei ging man im Versuch folgendermaßen vor: Die Zellen wurden auf einem mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen angesät und 24 Stunden vor Beginn der Messungen mit Minusmedium (kein FCS) ruhiggestellt. Für die Messung wurden die Zellen 15 min bei 37° C in HEPES-Ringer mit Fura-2-AM beladen. Fura-2-AM (= Fura-2-acetomethylester) ist lipophil, kann somit die Zellmembran durchdringen und verbleibt nach Abspalten des Acetomethylrestes durch Esterasen intrazellulär (als Fura-2).

Anschließend wurden die so mit Fura-2 beladenen Zellen in ihrem Deckgläschen auf den Objektisch des Mikroskops gelegt. Zur Messung wurde ein Axiovert 100 TV Mikroskop benutzt (400fache Vergrößerung, Ölimmersion, Zeiss) und ein automatischer Filterwechsler (Hamamatsu, Herrsching, Germany).

Indem man rechteckige Messbereiche, sog. „regions of interest“ (ROI), über die Zellen legt, kann man in diesen ausgewählten Arealen die Veränderung der Calciumkonzentration unter verschiedenen Bedingungen „live“ beobachten. In den hier durchgeführten Experimenten wurden pro Deckglas 9 bis 12 ROI gelegt. Zu Beginn des Experiments wurde die Hintergrundfluoreszenz gemessen, um sie als Korrektur von den später erhaltenen Fluoreszenzwerten der Zellen abzuziehen.

Am Ende eines solchen Experimentes wurden die Zellen mit zwei Kalibrationslösungen (Ca^{2+} -freie EGTA-Lösung und 1 mmol/l Ca^{2+} -Ringerlösung) überströmt, um das maximale Verhältnis 334/380 nm (R_{max}) und das minimale Verhältnis 334/380 nm (R_{min}) zu bestimmen. Beide Kalibrationslösungen enthielten den Calciumionophor Ionomycin (1 μ mol/l), so dass die intrazelluläre der

extrazellulär vorgegebenen Calciumkonzentration entsprach. Die Calciumkonzentration wurde nach Grynkiewicz (125) berechnet:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot \alpha \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

wobei α der Quotient der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm in Abwesenheit von Ca^{2+} ist, dividiert durch die Intensität bei im Experiment erreichter maximaler Ca^{2+} -Konzentration.

Bei K_d handelt es sich um den Dissoziationskoeffizienten von Fura-2 für Calcium, der 225 nmol/l beträgt.

Für die Versuche wurden Ringerlösungen verwendet, die mit HEPES oder HCO_3^- gepuffert waren.

2.3 Transfektion und Reportergen-Assay

Um das geeignete Konstrukt für die gewünschten Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden die HEK-Zellen mit den dementsprechenden Plasmiden transfiziert. Die Plasmide wurden aus Bakterienkolonien gewonnen und aufgereinigt (Plasmidaufbereitung s.u.). Für die Transfektion wurde nach der Lipofektionsmethode QIAGEN Polyfect-Reagenz (QIAGEN, Hilden, Germany) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

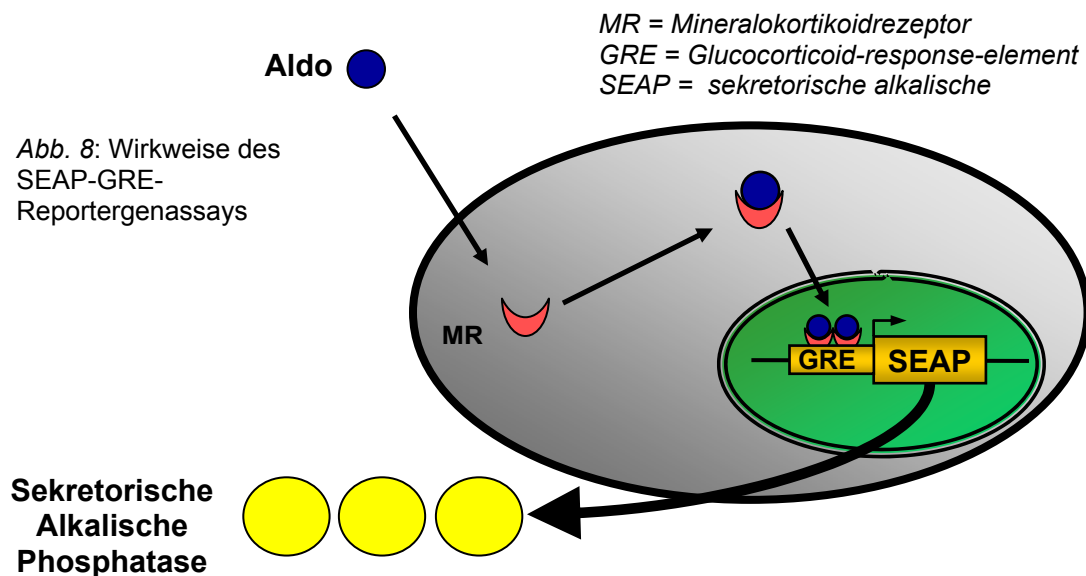
In der Regel wurden 2 μ l Polyfect pro 0,15 μ g Plasmid benutzt.

Benutzt wurden hierbei folgende Plasmide: pHis-LacZ (β -Galaktosidase), pEGFP (enhanced green fluorescent protein), EGFP-C1-hMR (humaner Mineralokortikoidrezeptor, an den EGFP gekoppelt ist; zur Verfügung gestellt von Dr. N. Farman), pcDNA1 (Leerplasmid) und ein SEAP-GRE-Konstrukt (Mercury Pathway Profiling Reportergen-Assay von CLONTECH Inc.).

Dahinter steckt folgende Überlegung: Transaktivierung des *Glucocorticoid-response-element* (GRE) durch den Mineralokortikoidrezeptor ist nur schlecht messbar. Daher ist in diesem Versuchsmodell am *Glucocorticoid-response-element* die genetische Information für eine sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) gekoppelt; wird GRE aktiviert, kommt es ebenfalls zur vermehrten Transkription und Bildung dieser Phosphatase, die von den Zellen nach extrazellulär ins Medium abgegeben wird und deren Aktivität dort relativ einfach bestimmt werden kann. Dabei gilt: je stärker der Mineralokortikoidrezeptor aktiviert wird, desto stärker wird

auch das GRE-Element transaktiviert und desto größer ist die im Medium gemessene Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase. D.h. die Aktivität besagter Phosphatase spiegelt die Mineralokortikoid-induzierte Transaktivierung des GRE-Elements adäquat wider.

Die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase wird hierbei mit Hilfe des AttoPhos-Systems von Promega (Mannheim, Germany) bestimmt: der Phosphatase wird ein geeignetes Substrat angeboten; nach dessen Verarbeitung kann seine Fluoreszenz (und somit die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase) gemessen werden (vgl. Abb. 8).



Da die HEK-Zellen, wie bereits erwähnt, keinen endogenen Mineralokortikoidrezeptor besitzen, werden sie mit dem humanen Mineralokortikoidrezeptor transfiziert. Dies hat den Vorteil, dass für jede Zelle rein formal gleiche Ausgangsbedingungen herrschen, zumindest was die Verfügbarkeit an Mineralokortikoidrezeptor anbelangt; um im Vergleich die Wirkung von Substanzen auf die Transaktivierungsaktivität des GRE in Abwesenheit des Mineralokortikoidrezeptors zu kontrollieren, wurden die HEK-Zellen dementsprechend mit dem Leerplasmid pcDNA1 anstelle des Mineralokortikoidrezeptors transfiziert.

Um den Erfolg der Transfektion abzuschätzen, wurde den Zellen EGFP als Kontrollplasmid zugegeben. Bei Versuchen, bei denen die Zellen mit Ionomycin inkubiert wurden, wurde hingegen β -Galaktosidase benutzt, da es bei der Kombination EGFP + Ionomycin zu starken Schwankungen bei der EGFP-Messung

kam, was sich eventuell mit einer unerwünschten Wechselwirkung zwischen Ionomycin und EGFP erklären ließe.

Generell wurde wie folgt vorgegangen:

Die Zellen wurden in einer 24-well-Schale angesät; nach 24 h wurden sie unter Benutzung von Minusmedium (kein FCS) transfiziert; nach weiteren 24 h wurden sie mit den gewünschten pharmakologischen Inhibitoren/Aktivatoren bzw. Chelatoren/Ionophoren in Minusmedium inkubiert. Nach 24 h (wahlweise auch 3, 6 oder 12 h) wurde das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit MOPS/Triton-Lysepuffer (15 ml 20 mM MOPS = 3-N-Morpholinopropansulfonsäure + 0,1% Triton-X-100 bei pH 7,4) lysiert.

Nach 30minütiger Inkubation wurden die Zellen abgekratzt, mit einer Pipette suspendiert und 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet.

Anschließend wurde im Medium die Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase bestimmt; im Zelllysat wurde am Fluoreszenzmessplatz, einem Multiwell Counter (Victor² Wallac), EGFP gemessen bzw. alternativ die Aktivität der β -Galaktosidase (weitere Erläuterungen s.u.).

Außerdem wurde mithilfe eines BCA-Assays (s. Kap. 2.4) die Proteinmenge bestimmt. Die gemessene sekretorische alkalische Phosphatase-Aktivität konnte somit sowohl in Relation zu der pro Well vorhandenen Proteinmenge als auch auf die Menge an vorhandenem Kontrollplasmid (EGFP oder β -Galaktosidase) bezogen und relativiert werden, so dass, unabhängig vom individuellen Transfektionserfolg, die Ergebnisse verschiedener Experimente untereinander vergleichbar wurden.

2.4 Bestimmung des Proteingehalts mittels BCA-Assay

Die Proteinbestimmung mittels BCA (Bicinchinonsäure) beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduzieren, die dann mit Bicinchinonsäure einen violetten Farbkomplex bilden.

Dazu wurde wie folgt verfahren: Zuerst wurde das BCA-Reagenz hergestellt, das sich zu 50 Teilen aus Reagenz A (Pierce, Rockford, IL) und zu einem Teil aus Reagenz B (4 % CuSO_4) zusammensetzt. Anschließend wurden je 300 μl des BCA-Reagenz zu je 15 μl Probe gegeben und das Ganze 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte bei 560 nm die Fluoreszenzmessung im Multiwell Counter.

Neben den Proben wurden auch BSA-Standardlösungen (0, 100, 300, 500, 700 mg/l) zwecks Eichung gemessen.

2.5 β -Galaktosidase-Assay

β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von β -Galaktosiden wie ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG). Die Hydrolyse von ONPG zum ONP-Anion produziert ein schwaches gelbes Licht, das bei einer Extinktion von 420 nm im Spektrophotometer gemessen werden kann. Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde nach der Anleitung und mit den Substanzen des β -Gal Assay Kits von Invitrogen durchgeführt: Zuerst wurden die Zellen lysiert (Entfernen des Mediums, Zugabe von 1X PBS, 5 Minuten Zentrifugieren bei 250•g, dann Zugabe von Lyse-Puffer, zweimaliges Einfrieren bei -80°C und Wiederauftauen zur endgültigen Zelllyse). Anschließend erfolgt die eigentliche Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität. Dazu wird zu dem erhaltenen Zell-Lysat Cleavage Buffer (enthält β -Mercaptoethanol und ONPG) zugegeben und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Es entwickelt sich eine gelbliche Färbung. Diese Reaktion wird abgestoppt durch Zugabe von StopBuffer. Die Messung der Absorption erfolgt bei 420 nm.

2.6 EGFP-Fluoreszenz

Um die Lokalisation des Mineralokortikoidrezeptors innerhalb der Zelle (Zytosol oder Zellkern) unter unterschiedlichen Umgebungsbedingungen beurteilen zu können, wurden die Zellen auf Deckgläschen angesät, mit EGFP-hMR transfiziert (wie oben beschrieben), 24 h mit unterschiedlichen Zusätzen inkubiert und anschließend die Lokalisation des MR mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 100 TV Mikroskop; Zeiss, Oberkochen, Germany) sichtbar gemacht. Das war dadurch möglich, dass der MR an EGFP gekoppelt war, und somit die Lokalisation des EGFP auch dem Aufenthaltsort des MR entsprach. Die Zellen wurden hierbei mit 480 nm angeregt und emittierten nach Anregung des EGFP selbst eine Wellenlänge von 520-560 nm. Bilder konnten mit Hilfe einer ICCD-Kamera (intensified charge-coupled device camera, Hamamatsu, Herrsching, Germany) gemacht werden.

2.7 Bestimmung der EGFP-hMR-Expression mittels ELISA

Um festzustellen, ob die Anwesenheit der verschiedenen pharmakologischen Substanzen die Expression des EGFP-hMR und somit die insgesamt vorhandene Menge an MR beeinflussen könnte, wurde ein ELISA benutzt.

Dazu wurden HEK-Zellen in einer 96-well-Platte angesät (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA), nach 24 h mit EGFP-hMR transfiziert, nach abermals 24 h wurden die Inkubationszusätze hinzugefügt. Nach 24 h Inkubation (also insgesamt 48 h nach Transfektion) erfolgte die Detektion des EGFP-hMR im ELISA: die Zellen wurden mit 4 % Formaldehyd in PBS fixiert und mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 10% FCS in Permeabilisierungspuffer (0,1% Triton X-100 in PBS und 37 mg/l Orthovanadat) geblockt. Über Nacht wurden die Zellen mit Anti-GFP-Erstantikörper (Santa-Cruz, Verdünnung 1:1000) inkubiert. Am folgenden Tag wurde rabbit-Peroxidase-Zweitantikörper (Rockland, Verdünnung 1:10000) in Permeabilisierungspuffer mit 5% BSA zugegeben. Nach einer Stunde wurde die Menge an so gebundenem Antikörper bestimmt, indem der Peroxidase ein geeigetes Substrat angeboten wurde, HRP-Substrat (Meerrettich-Peroxidase), und die umgesetzte Menge an Substrat mittels Fluoreszenzmessung bei 490 nm (Victor², Wallac, Turku, Finnland) bestimmt wurde. Die HRP-Substrat-Lösung setzte sich im einzelnen aus folgenden Substanzen zusammen: 0,5 mg/ml o-Phenylendiamin (SIGMA), 11,8 mg/ml Na₂HPO₄, 7,3 mg/ml Zitronensäure und 0,015 H₂O₂ (15 Minuten Inkubation im Dunkeln).

Um eine eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse durch die de-novo-Synthese des EGFP-hMR zu erkennen bzw. auszuschalten, wurden alle hier untersuchten Substanzen auch in Gegenwart des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid getestet. Der Proteingehalt in den wells wurde im ELISA mit Trypanblau-Färbung bestimmt. Dazu ging man folgendermaßen vor: nach der oben geschilderten Fluoreszenzmessung wurden die wells geleert, dreimal mit PBS gewaschen, anschließend 5 Minuten lang bei 37° C mit 50 µl 0,2% Trypanblaulösung inkubiert. Hierauf wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und dann 30 – 60 Minuten mit 50 µl einer 1%igen SDS-Lösung auf einem Schüttler inkubiert. Nun konnte bei 595 nm die Extinktion und somit der Proteingehalt pro well bestimmt werden.

2.8 Radikalmessung mittels H₂DCFDA/H₂DCFDA-AM

Um die H₂O₂-Konzentration innerhalb oder außerhalb der Zellen zu bestimmen, wurde ein Radikal-Assay mit H₂DCFDA (2', 7'-Dichlorodihydrofluoreszeindiacetat) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bzw. H₂DCFDA-AM (2',7'-Dichlorodihydrofluoreszeindiacetat, Acetylesther; ebenfalls Molecular Probes) benutzt. Diese Messung beruht auf folgendem Prinzip: Bei Fluoreszein handelt es sich um die reduzierte Form eines Xanthens und ist somit farblos und nicht-fluoreszierend. Erst nach Oxidation mit H₂O₂ wird es zu einem fluoreszierenden Farbstoff (Emission bei 530 nm). H₂DCFDA-AM ist aufgrund seines Acetomethylester-Restes besonders gut membrandurchlässig und verbleibt, nach intrazellulärer Abspaltung des Acetomethylester-Restes durch Esterasen, auch in der Zelle, und kann so gut zur Messung der intrazellulären H₂O₂-Konzentration genutzt werden (127).

H₂DCFDA wurde hingegen benutzt, um extrazelluläre H₂O₂-Konzentrationen abzuschätzen; da H₂DCFDA nicht nur extrazellulär verbleibt, sondern auch in die Zelle hineingelangen kann, sind diese Messungen mit Bedacht zu interpretieren.

Hierzu wurden Zellen in einer 24-well-Platte angesät, nach 24 h mit dem EGFP-hMR transfiziert, nach abermals 24 h erfolgte die Inkubation mit verschiedenen Zusätzen (Inkubationsdauer allerdings unterschiedlich wählbar, abhängig vom gewünschten Experiment).

Zum Zeitpunkt der Messung wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit HEPES-Ringer (bei 37° C) gewaschen und anschließend HEPES-Ringer (pH 7,4 bei 37° C) mit 5 µM H₂DCFDA (in DMSO gelöst) und eventuell, je nach Wunsch, neue Zusätze dazugegeben. Hierauf musste die Platte zur Verlaufsmessung sofort in den auf 37° C vorgewärmten Fluoreszenzmesser (Victor² Wallac) gestellt werden und die Messung beginnen.

Am Ende der Messung wurde der Proteingehalt mit Hilfe eines BCA-Assays bestimmt (s. Kap. 2.4).

2.9 Plasmidgewinnung

Die verwendeten Plasmide wurden aus E. coli-Bakterienkolonien gewonnen. Die Bakterien mit den Stammplasmiden wurden bei -80° C aufbewahrt. Zur Plasmidgewinnung wurden 1–2 Tropfen der Bakteriensuspension in 5 ml LB-

Medium (Luria-Bertani-Medium) gegeben und über Nacht zur Vermehrung bei 37° C in einen Schüttler gestellt. Zwecks Selektion nur der Bakterien, die das gewünschte Plasmid auch wirklich enthielten, wurde noch ein Antibiotikum dazugegeben (Antibiotikaresistenz auf dem demselben Plasmid). Zur Gewinnung von EGFP- und EGFP-hMR-Plasmiden wurde hierzu Kanamycin (50 µg/ml) hinzugefügt, bei allen anderen in den vorliegenden Experimenten benutzten Plasmiden wurde Ampicillin (60 µg/ml) verwendet.

Am folgenden Tag wurden die Bakterien lysiert, die Proteine ausgefällt und die DNA isoliert, um Rein-Plasmide zu erhalten. Alle diese Arbeitsschritte wurden unter Benutzung und nach Anleitung des Quiaprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die so gewonnene DNA wurde in Sigma-Wasser bei -20° C aufbewahrt. Zuvor erfolgte noch die Quantifizierung der DNA im Photometer (BIO-RAD, SmartSpec™ 3000).

2.10 Materialien

BIM stammt von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland).

Alle anderen Materialien stammen, falls nicht anders angegeben, von Sigma, München, Deutschland.

Die Ringer-Kontroll-Lösungen setzten sich wie folgt zusammen (Angaben in mmol/l): NaCl 130.0, KCl 5.4, CaCl₂ 1.0, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 1.0, HEPES 10 und Glucose 5 (pH 7,4 bei 37°C), inklusive der unterschiedlichen Vehikel (Ethanol oder DMSO ≤ 1‰).

2.11 Statistik

Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler) dargestellt. Die Signifikanz unterschiedlicher Ergebnisse wurde mittels gepaartem oder ungepaartem Student's t-test oder ANOVA untersucht. Unterschiedliche Ergebnisse wurden ab einem $p < 0,05$ als signifikant betrachtet. Zellen von mindestens zwei verschiedenen Passagen wurden für jeden Versuchsdurchlauf benutzt. N bezeichnet die Anzahl der Zellen oder wells, die in den jeweiligen Experimenten benutzt worden sind.

3. Ergebnisse

3.1 Grundlagen: SEAP-GRE-Aktivität in HEK- und HEK-MR-Zellen

Wie bereits im Abschnitt „Material und Methoden“ erwähnt, exprimieren HEK-Zellen physiologischerweise weder den MR (89) noch die 11- β -HSD2 (45) in nachweisbaren Mengen.

Über einen eigenen, also endogenen GR hingegen verfügen sie, wie in unserem Labor mittels Immunoblot gezeigt werden konnte (128).

Zur Aktivierung des GR bzw. MR wurden Aldosteron, Hydrocortison und Dexamethason benutzt.

Klassischerweise gilt hierbei Aldosteron als Aktivator des MR, Dexamethason und Hydrocortison als Aktivatoren des GR.

Für die Interpretation der in unserem Labor gemachten Experimente war vor allem die Frage wichtig, wie die HEK-Zellen funktionell auf die Gabe dieser Hormone in unterschiedlichen Konzentrationen reagieren.

Dabei ergab sich Folgendes:

HEK-Zellen, die nur mit pcDNA transfiziert waren, also nur über den GR verfügten, zeigten auf Gabe von je 1 nM Aldosteron, Dexamethason oder Hydrocortison keine SEAP-GRE-Aktivierung. Auch 100 nM Aldosteron führten bei pcDNA-transfizierten Zellen zu keiner messbaren Reaktion, während die Gabe von 100 nM Dexamethason und 100 nM Hydrocortison zu einer deutlichen SEAP-GRE-Aktivierung führten. Diese Aktivierung ist als Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors zu sehen. Die fehlende Reaktion der Zellen auf 100 nM Aldosteron ist ein weiterer Beweis dafür, dass die HEK-Zellen keinen endogenen MR aufweisen (s. Abb. 9).

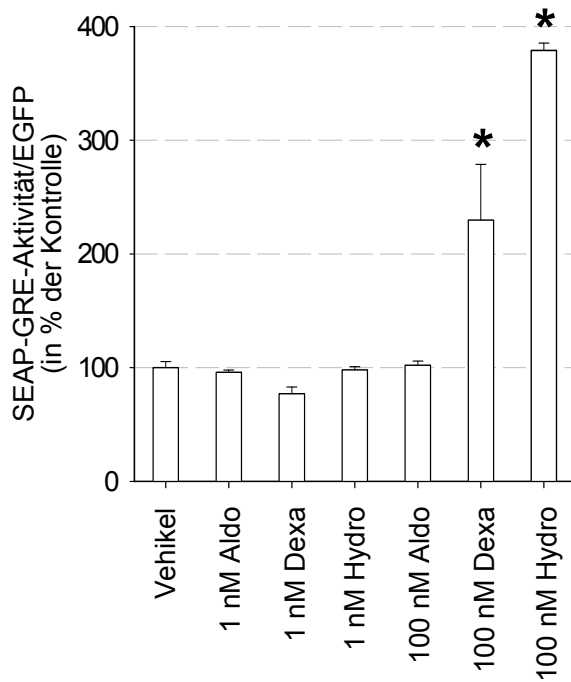


Abb. 9: Wirkung von Aldosteron, Dexamethason und Hydrocortison in unterschiedlichen Konzentrationen in pcDNA-transfizierten Zellen (N= 8-10)

HEK-Zellen, die mit EGFP-hMR transfiziert wurden, reagieren - im Gegensatz zu ihren nur mit pcDNA-transfizierten Zell-Kollegen – bereits auf Gabe von je 1 nM Aldosteron, Dexamethason und Hydrocortison (s. Abb. 10). Dies ist durchweg als Aktivierung des MR zu sehen, da, wie gerade eben erst dargelegt, der GR bei solch niedrigen Konzentrationen der verwendeten Hormone nicht aktiviert wird.

Der Grad der Aktivierung spiegelt hierbei die unterschiedlichen Affinitäten der benutzten Hormone Aldosteron, Dexamethason und Hydrocortison wider. Die sehr starke Reaktion des SEAP-GRE-Systems durch 100 nM Aldosteron ist angesichts der bereits durchgeführten Überlegungen rein MR-vermittelt, während die ebenfalls hohen SEAP-GRE-Aktivitäten, die durch die Gabe von 100 nM Dexamethason erzielt wurden, am ehesten eine Überlagerung von GR- und MR-Erregung darstellen (vgl. Tab. 1).

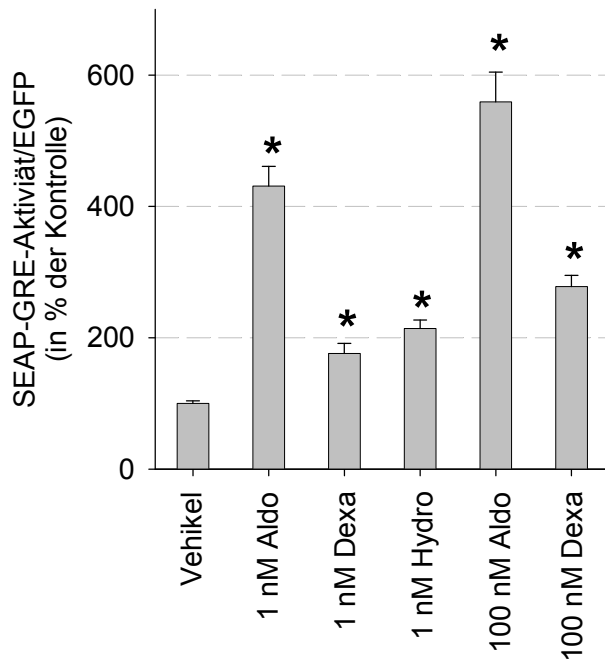


Abb. 10: Wirkung von Aldosteron, Dexamethason und Hydrocortison in unterschiedlichen Konzentrationen in EGFP-hMR transfizierten Zellen (N= 12-30)

	1 Aldo	1 Hydro	1 Dexa	100 Aldo	100 Hydro	100 Dexa
GR	-	-	-	-	+	+
MR	+	+	+	+	+	+

Tab. 1: Überblick über Aktivierungspotenzial von GR/MR durch die verwendeten Hormone in den entsprechenden Dosierungen (Mengenangaben der Hormone in nM)

In den folgenden Experimenten wurden die benutzten Hormone in der Regel in der Dosierung 1 nM benutzt (wenn nicht anders angegeben), da dies am ehesten physiologischen Bedingungen entspricht (physiologische Aldosteron-Konzentration im Plasma 0,93 nmol/l (16)).

3.2 Wirkung von Calcium auf den hMR

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, gehört die schnelle intrazelluläre Calcium-Erhöhung zu den nicht-genotropen Aldosteron-Wirkungen. Speziell für die

hier verwendeten HEK-Zellen wurde gezeigt, dass Aldosteron zu einer intrazellulären Calcium-Zunahme führt, die sich letztlich auf einem Plateau von ungefähr 80 nmol/l einpendelte (89).

Durch Erhöhung und Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Calcium-Konzentration an sich wiederum einen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität des MR hat.

Um die Calcium-Konzentration zu beeinflussen, wurden zwei verschiedene Substanzen benutzt:

Um die Calcium-Konzentration intrazellulär zu senken, wurde BAPTA-AM benutzt, ein Calcium-Chelator. Bei BAPTA-AM handelt es sich um einen lipophilen Acetomethylester, so dass BAPTA-AM leicht die Zellwand durchdringen kann; nach Abspaltung des lipophilen Endes, des Acetomethylesters, durch intrazelluläre Esterasen verbleibt das Rest-Molekül BAPTA zusammen mit dem chelierten Calcium in der Zelle, so dass auf alle Fälle die gegebene Menge an Calcium-Chelator auch in der Zelle verbleibt und nicht wieder aus der Zelle hinausdiffundiert. Um die Calcium-Konzentration zu erhöhen, wurde zu den Zellen Ionomycin, ein Calcium-Ionophor, gegeben, das die Permeabilität der Zellmembran für Calcium steigert und somit durch Calcium-Einstrom aus dem Extrazellulärraum das intrazelluläre Calcium-Angebot erhöht.

3.2.1 Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration

Zuerst wurde die Wirkung von BAPTA-AM (50 μ M) auf bloße pcDNA und auf EGFP-hMR überprüft, d.h. in Abwesenheit von Aldosteron, um eine eventuelle hMR-unabhängige (nur pcDNA-transfiziert) oder auch Aldosteron-unabhängige (EGFP-hMR-transfiziert) Eigenwirkung des BAPTA-AM auf das SEAP-GRE-Element zu überprüfen. Die Daten zeigen, dass BAPTA-AM ohne Zugabe von Aldosteron keinen Effekt hat, d.h. BAPTA-AM besitzt weder einen pharmakologischen Eigeneffekt auf den MR noch auf den GR, und somit nicht auf unser SEAP-GRE-Versuchsmodell (s. Abb 11.).

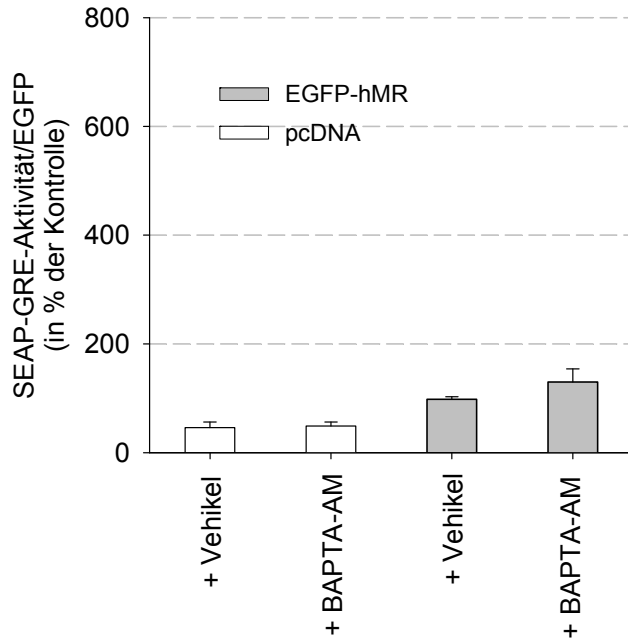


Abb. 11: BAPTA-AM erzielt keine Eigenwirkung am MR in Abwesenheit von Aldosteron (N=6-8)

Hierauf wurde die Beeinflussung der Aldosteron-induzierten MR-Aktivierung durch BAPTA-AM untersucht, sowohl in Gegenwart von 100 nM als auch von 1 nM Aldosteron. Bei beiden Dosierungen führte die Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch BAPTA-AM zu einer signifikanten Zunahme der SEAP-GRE-Aktivität (s. Abb. 12).

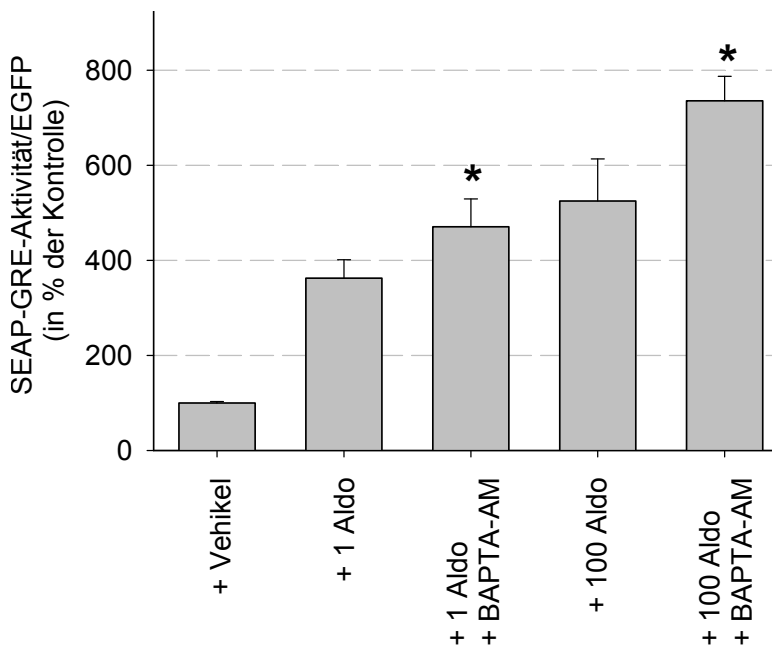
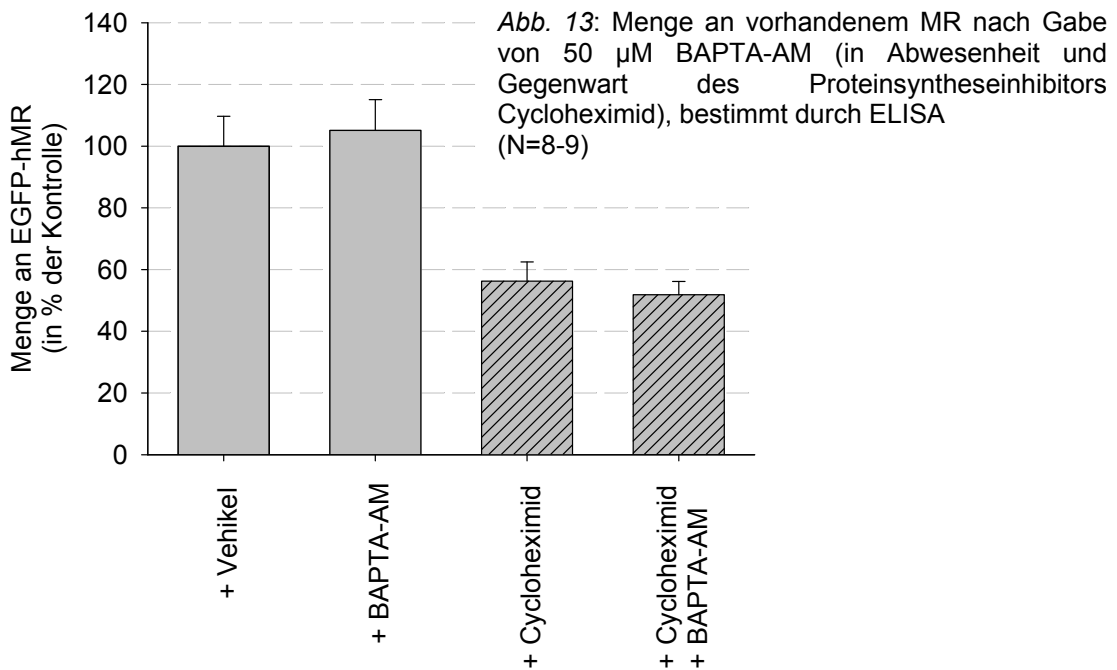


Abb. 12: EGFP-transfizierte Zellen nach 24-h-Inkubation mit Aldosteron (1 und 100 nM) sowie Aldosteron und 50 μ M BAPTA-AM (N= 9-12); die Senkung von $[Ca^{2+}]_i$ führt zu einer signifikanten Zunahme der SEAP-GRE-Aktivität

Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass BAPTA-AM und somit Calcium keinerlei Einfluss auf Expression und De-novo-Synthese des EGFP-hMR hatten. Dies schließt eine eher indirekte Beeinflussung der MR-Aktivität und des SEAP-

GRE-Systems aus, sondern lässt Calcium eher in die Rolle eines mehr oder weniger direkt involvierten Botenstoffs schlüpfen (s. Abb. 13)



3.2.2 Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde durch Gabe von Ionomycin erhöht. Ionomycin wurde in 2 Dosierungen verwendet, in 1 nM und in 100 nM. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops und nach Gabe des Calcium-sensitiven Farbstoffs Fura-2 (s. Material und Methoden) konnte die Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Ionomycin gemessen werden:

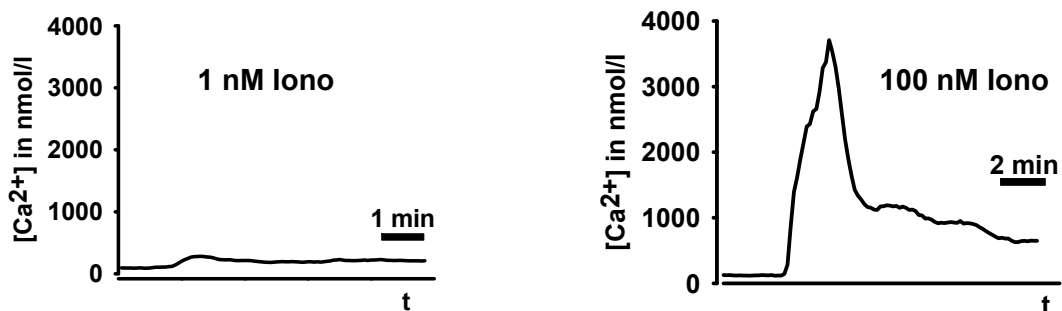


Abb. 14: intrazelluläre Calcium-Konzentration im zeitlichen Verlauf nach Gabe von Ionomycin (N=12)

Nach einem anfänglichen Peak pendelte sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration auf einem Plateau ein. Bei Gabe von 1 nM Ionomycin lag dieses

Plateau bei ca. dem 2 – 3fachen der ursprünglichen Calcium-Konzentration, bei 100 nM bei dem 6 – 10fachen.

Die in Abb. 14 dargestellten zeitabhängigen Verläufe der Calcium-Konzentration nach Gabe von Ionomycin ähneln dem Verlauf der intrazellulären $[Ca^{2+}]$ -Änderung nach Aktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (129).

Diese erhöhten Calcium-Konzentrationen blieben während der Messung stabil, d.h., man kann davon ausgehen, dass dieser Effekt des erhöhten Calciums anhält. Allerdings kann keine exakte Angabe darüber gemacht werden, wie hoch die Calcium-Konzentration beispielsweise nach 24 h war, da aus technischen Gründen die Calcium-Messung nicht über einen solchen Zeitraum durchgeführt werden konnte.

Es sei noch erwähnt, dass in den SEAP-GRE-Experimenten, in denen Ionomycin verwendet wurde, nicht EGFP als Kontrollplasmid eingesetzt wurde, sondern β -Galaktosidase, da es bei gleichzeitigem Einsatz von Ionomycin und EGFP wiederholt zu starken Schwankungen der EGFP-Messungen gekommen war.

In pcDNA-transfizierten Zellen (ohne Hormongabe) zeigte Ionomycin keinen Effekt. Allerdings führte die Gabe von Ionomycin in beiden Dosierungen zu einer Senkung der SEAP-GRE-Aktivität in EGFP-hMR-transfizierten Zellen, und zwar bereits ohne Zugabe von Aldosteron. Es ist nicht anzunehmen, dass dies an einer unspezifischen pharmakologischen Stimulierung des SEAP-GRE-Systems durch Ionomycin lag, da es dann ja auch schon bei den nur mit pcDNA transfizierten Zellen zu einer Reaktion hätte kommen müssen. Am ehesten ließe sich dieses Phänomen damit erklären, dass bereits im Ruhezustand, also im nicht Aldosteron-aktivierten Zustand eine gewisse Grundaktivität des MR besteht, die durch Ionomycin beeinflusst werden konnte. Bei gleichzeitiger Gabe von Aldosteron bewirkte Ionomycin (1 nM und 100 nM) eine signifikante Abnahme der SEAP-GRE-Aktivität. Die nochmalige starke Abnahme durch 100 nM Ionomycin in Gegenwart von Aldosteron im Vergleich zur Abnahme bei nur nur 1 nM Ionomycin war nur knapp nicht signifikant.

(s. Abb. 15).

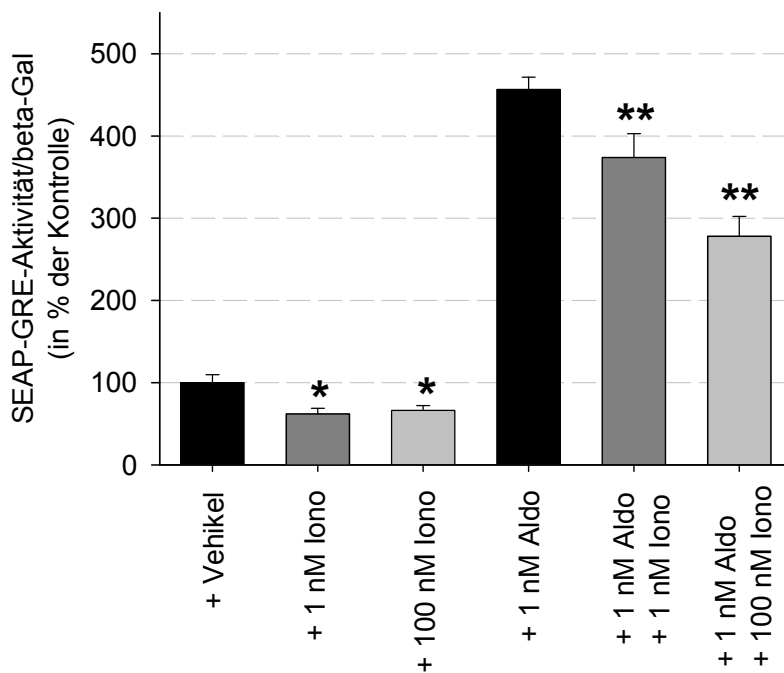


Abb. 15: EGFP-hMR- transfizierte Zellen nach Inkubation mit 1 nM Aldosteron und Ionomycin (1 und 100 nM) (N=9-12)

Ionomycin hatte keinen Einfluss auf den Abbau, De-novo-Synthese oder Expression des EGFP-hMRs. (s. Abb. 16)

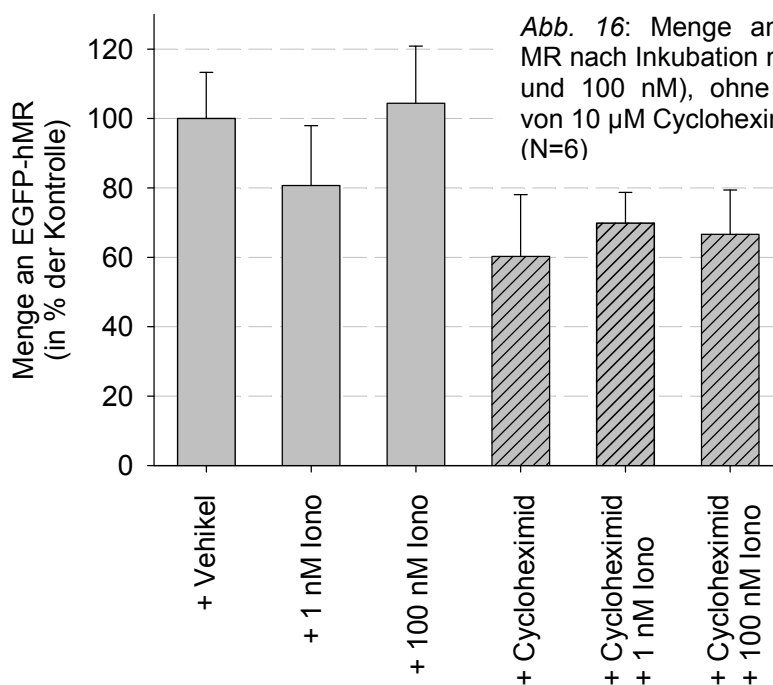


Abb. 16: Menge an vorhandenem MR nach Inkubation mit Ionomycin (1 und 100 nM), ohne und mit Gabe von 10 µM Cycloheximid (N=6)

Aus den Experimenten mit Ionomycin und BAPTA-AM lässt sich folgendes ableiten:

Eine Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration wirkt aktivierend auf den MR, eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration hemmend auf den MR. Da eine der schnellen Wirkungen von Aldosteron, des klassischen MR-Hormons, eine intrazelluläre Calcium-Erhöhung darstellt, könnte dieses Calcium die entscheidende Rolle im Sinne eines negativen Feedbacks darstellen, um die durch Aldosteron ausgelöste Aktivierung des MR gleichsam durch einen der „schnellen“ Nebeneffekte des Aldosterons unter Kontrolle zu halten.

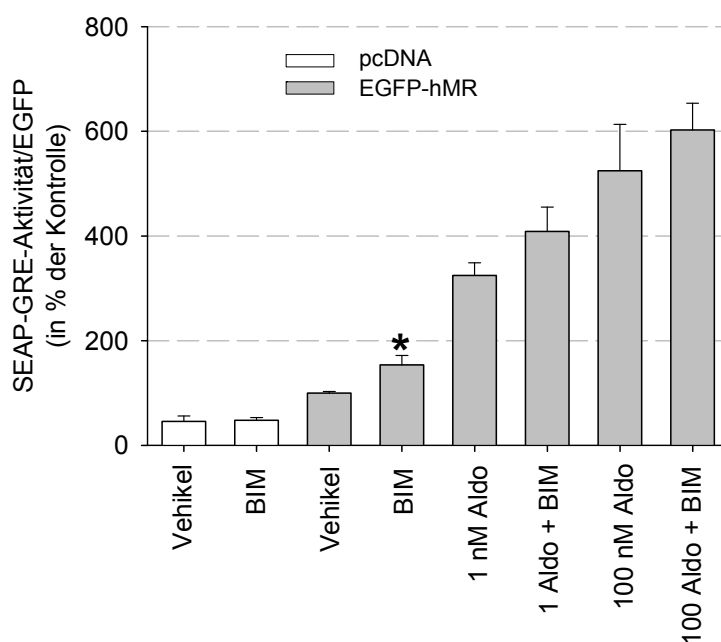
3.3 Wirkung der Proteinkinase C auf den hMR

3.3.1 Hemmung der Proteinkinase C

Um den Einfluss der Proteinkinase C (PKC) auf die hMR-Aktivität zu untersuchen, wurde zunächst der PKC-Hemmstoff Bisinolylmaleimid (BIM) eingesetzt, der in seiner Struktur Staurosporin ähnelt. BIM ist ein kompetitiver Inhibitor an der ATP-Bindungsstelle der PKC. BIM bindet nicht spezifisch nur an eine spezielle Isoform der PKC, sondern deckt einen Großteil der PKC-Isozyme ab (PKC α -, β _I-, β _{II}-, γ -, δ - und ϵ -Isozyme) (130-132).

BIM wurde in der Konzentration 200 nM eingesetzt.

Wie die Abbildung 17 zeigt, übt BIM keinen signifikanten Effekt auf die Aldosteron-induzierte MR-Aktivität aus. Die knapp signifikante SEAP-GRE-Aktivierung durch alleinige Gabe von BIM, d.h. in Abwesenheit von Aldosteron, lässt sich u.U. durch



eine unspezifische Wirkung von BIM am GRE-Element in Ruhe erklären, die bei „richtiger“ Aktivierung des GRE-Elementes durch Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung statistisch nicht mehr ins Gewicht fällt (s. Abb. 17).

Abb. 17: pcDNA-transfizierte und EGFP-hMR-transfizierte Zellen nach Inkubation mit 200 nM BIM (in Abwesenheit und Gegenwart von Aldosteron) (N=12-15)

Die scheinbare Abhängigkeit der BIM-Wirkung von der An- bzw. Abwesenheit von Aldosteron spiegelt sich auch in den Ergebnissen der Experimente wider, in denen die EGFP-hMR-Menge im ELISA untersucht wurde (s. Abb. 18):

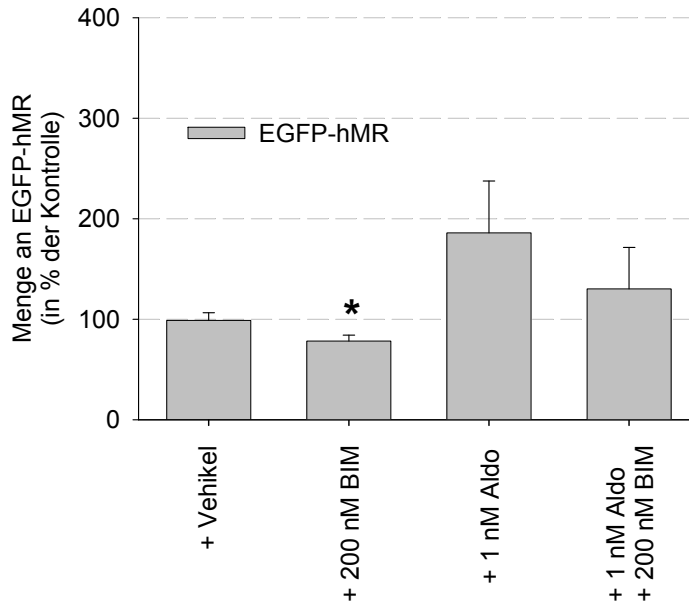


Abb.18: EGFP-hMR-Elisa, um den Einfluss von BIM auf die vorhandene Menge an EGFP-hMR zu untersuchen; die Zugabe von Aldo führte zu keiner signifikanten Änderung der EGFP-hMR-Menge (auch wenn der erste Blick auf die Graphik anderes vermuten lässt); Ursache für die Diskrepanz zwischen optischem Eindruck und Ergebnis war die große Streubreite der Ergebnisse (N=10-11)

Die EGFP-hMR-Menge ist signifikant erniedrigt bei bloßer Anwesenheit von BIM im Vergleich zu Vehikel; reichert man das Medium aber mit Aldosteron an, so ändert die Zugabe von BIM nichts an der hMR-Menge. Ob dies ebenfalls auf eine unspezifische Wirkung von BIM auf den hMR zurückzuführen ist oder ob eine tatsächliche spezifische BIM-Wirkung durch Interaktionen mit Aldosteron eliminiert wird, lässt sich allein aufgrund dieser Experimente mit BIM nicht klären. Auf jeden Fall kann man aber daraus den Schluss ziehen, dass eine Hemmung der PKC zumindest die Aldosteron-induzierte hMR-Transaktivierungsaktivität nicht beeinflusst.

3.3.2 Aktivierung der Proteinkinase C

Da die Hemmung der PKC durch BIM somit zu keinen vollkommen einheitlichen Ergebnissen führte, wurde auch noch untersucht, was passiert, wenn die PKC aktiviert wird.

Dazu wurden zwei unterschiedliche PKC-Aktivatoren benutzt, DOG (Dioctanlyglycerol) und der Phorbolster PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate).

DOG wurde in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt, bei PMA wurden 10 nM verwendet.

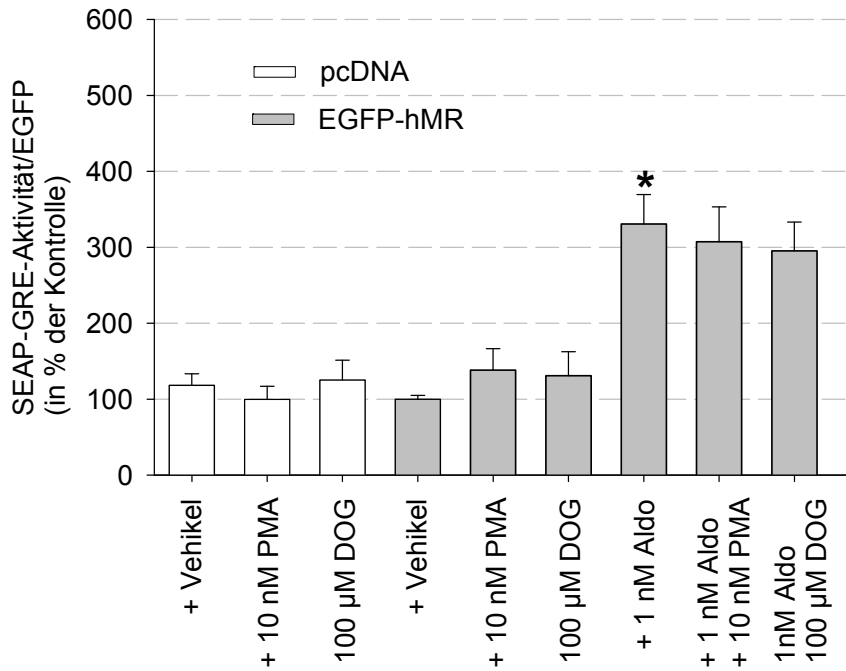


Abb. 19: Aktivierung der PKC (durch 10 nM PMA bzw. 100 μM DOG) führt zu keinerlei Veränderung der SEAP-GRE-Aktivität, sei es in An- oder Abwesenheit von Aldosteron (N=6-9)

Wie aus Abb. 19 zu ersehen ist, führt die Aktivierung der PKC zu keiner signifikanten Veränderung der GRE-Aktivität, sei es mit oder ohne Aldosteron. Auch die Expression bzw. der Abbau des EGFP-hMR wird nicht durch PMA oder DOG beeinflusst (s. Abb. 20).

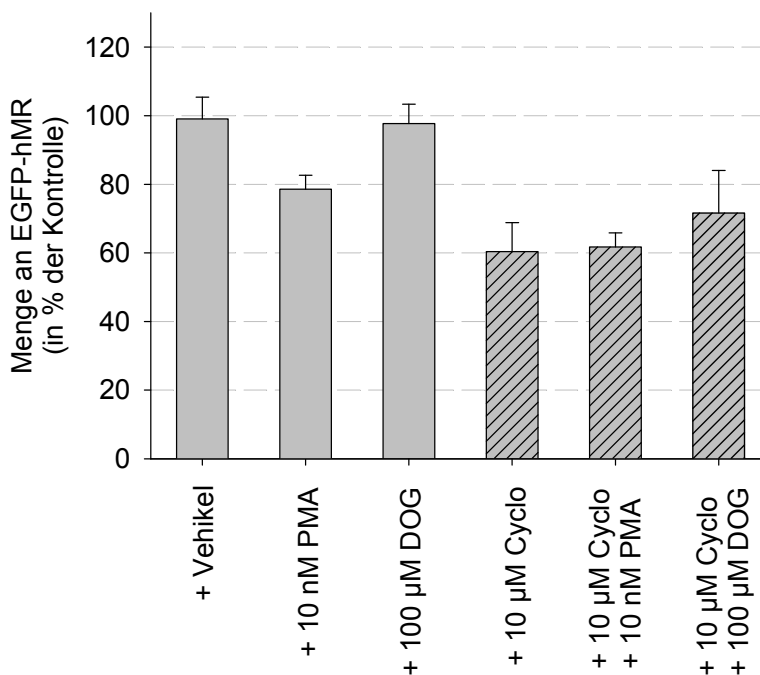


Abb. 20: PMA und DOG beeinflussen nicht die EGFP-hMR-Menge an sich (N=3-6)

In Anbetracht aller Ergebnisse (keinerlei Beeinflussung des GRE-Elementes durch Aktivierung der PKC, keine GRE-Aktivierung durch Hemmung der PKC in Anwesenheit von Aldosteron, dafür aber scheinbare Beeinflussung des hMR bzw. des GRE-Elementes durch BIM in Abwesenheit von Aldosteron) kann man am ehesten davon ausgehen, dass die vereinzelt durch BIM in Aldosteron-Abwesenheit hervorgerufenen Effekte nicht so sehr auf komplexen Regulationsmechanismen der PKC im Hinblick auf den MR beruhen, sondern auf unspezifischen „Neben“-Wirkungen von BIM.

Während Calcium also eindeutig einen hemmenden Effekt auf die GRE-Aktivierung ausübt, ist die PKC - zumindest unter unseren experimentellen Bedingungen - nicht an der Aldosteron-induzierten hMR-Transaktivierungsaktivität beteiligt.

3.4 Wirkung der PI-3-Kinase auf EGFP-hMR

Um die Rolle der PI-3-Kinase bei der Aldosteron-induzierten hMR-Aktivierung zu untersuchen, wurden zwei Hemmer der PI-3-Kinase benutzt: Wortmannin (in 10 nM) und LY294002 (in 10 μ M). LY294002 ist hierbei der spezifischere Inhibitor von beiden, Wortmannin hemmt auch andere Kinasen, insbesondere die Myosin-Leichtketten-Kinase (147, 148, 149). Außerdem handelt es sich bei Wortmannin - im Gegensatz zu LY294002 - um einen irreversiblen Inhibitor.

Wie Abb. 21 zeigt, ist Wortmannin in der Lage, die SEAP-GRE-Aktivität universal zu senken, d.h. sowohl in pcDNA- als auch in EGFP-hMR-transfizierten Zellen und dies wiederum sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Aldosteron.

LY294002 zeigt hingegen keinerlei Einfluss auf die SEAP-GRE-Aktivität.

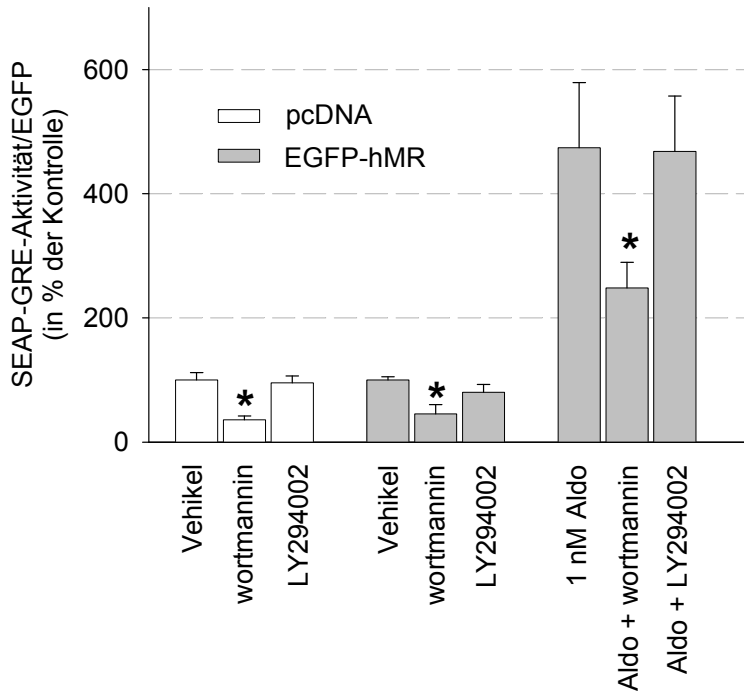


Abb. 21:
SEAP-GRE-Aktivität in An- und Abwesenheit von Aldo (1 nM) unter dem Einfluss von 10 nM Wortmannin (irreversibel) bzw. 10 μ M LY294002 (reversibel) (N=9)

Wortmannin ändert allerdings nichts an der Gesamtmenge bzw. Expression des EGFP-hMR in den HEK-Zellen (s. Abb. 22).

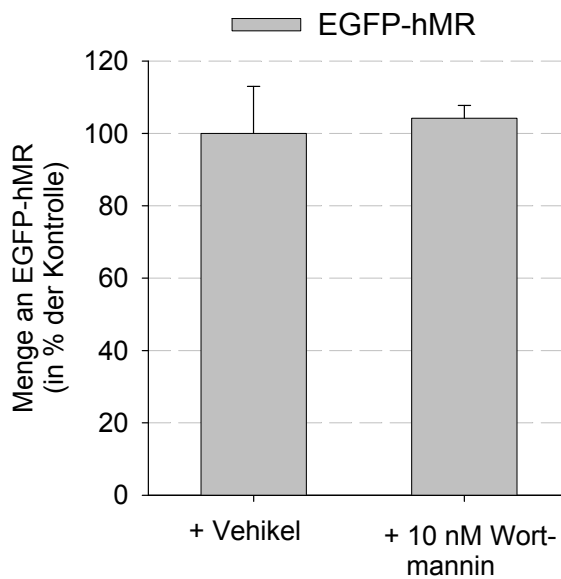


Abb. 22:
Elisa zum Nachweis, dass Wortmannin nichts an der Expression des EGFP-hMR ändert (N=5)

3.5 H₂O₂ und der MR

3.5.1 Wirkung von H₂O₂ auf die intrazelluläre ROS-Homöostase

Bevor die Wirkung von exogen zugeführtem H₂O₂ auf die MR-Aktivierung untersucht werden konnte, musste zunächst geklärt werden, welchen Einfluss exogen

zugeführtes H₂O₂ auf die ROS-Homöostase (ROS = reactive oxygen species) hat. In Zusatzversuchen unseres Labors (Daten hier nicht gezeigt, vgl. (128)) wurde mithilfe des H₂O₂-sensitiven Farbstoffs DCFDA-AM untersucht, welche Menge an H₂O₂ von außen einer Zelle zugeführt werden kann, bevor ihre scavenger-Kapazität, also ihre Fähigkeit, Radikale abzufangen und so ihre ROS-Homöostase aufrechtzuerhalten, erschöpft ist. Solange die Zelle noch über ausreichende Pufferkapazitäten für Radikale verfügt, sollte die messbare Menge an H₂O₂ nicht zunehmen. Es zeigte sich, dass die HEK-Zellen eine exogene H₂O₂-Zufuhr $\leq 500\mu\text{M}$ gut vertrugen; erst ab einer verabreichten Menge von $> 500\mu\text{M}$ waren die HEK-Zellen nicht mehr in der Lage, ihre ROS-Homöostase aufrechtzuerhalten: die gemessene H₂O₂-Menge stieg stark an.

3.5.2 Wirkung von H₂O₂ auf die SEAP-GRE-Aktivität

3.5.2.1 Herunterregulierung der SEAP-GRE-Aktivität durch H₂O₂

Die Gabe von H₂O₂ führt zu einer deutlichen Abnahme der SEAP-GRE-Aktivität, und zwar ab einer Konzentration von 0,5 mM H₂O₂. Geringere Konzentrationen (10 oder 100 μM H₂O₂) rufen am GRE-Element scheinbar keinen Effekt hervor.

Zu dieser Abnahme der GRE-Aktivität kommt es universal, d.h. unabhängig von der Zugabe von Hormonen und unabhängig davon, ob nur der GR oder auch der MR vorhanden ist.

So sinkt nach entsprechender H₂O₂-Gabe die SEAP-Aktivität in Zellen, die nur den GR enthalten (pcDNA-transfiziert) und auch in solchen, die MR und GR enthalten (EGFP-hMR-transfiziert); sowohl ohne hormonelle Aktivierung von MR und GR (also in bloßer Gegenwart von Vehikel, s. Abb. 23) als auch nach Gabe von Hormonen (in Abb. 24 SEAP-GRE-Aktivität in Gegenwart von Aldosteron dargestellt) bewirkt H₂O₂ die Herunterregulierung der SEAP-GRE-Aktivität (s. Abb. 23-24).

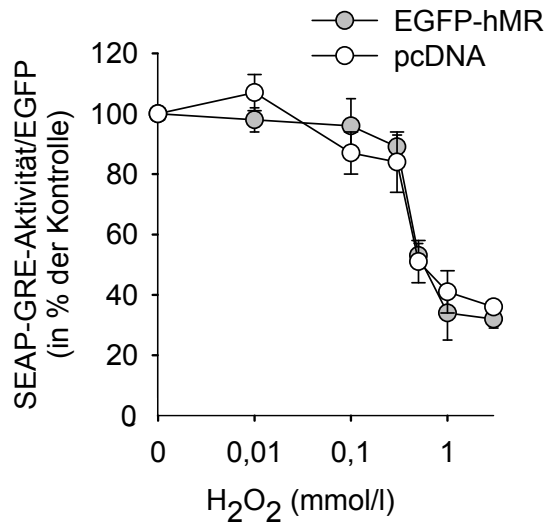


Abb. 23: Einfluss von H₂O₂ in steigender Konzentration auf die SEAP-GRE-Aktivität ohne und mit hMR; es erfolgte zunächst keine zusätzliche Hormonstimulation (N=6-12)

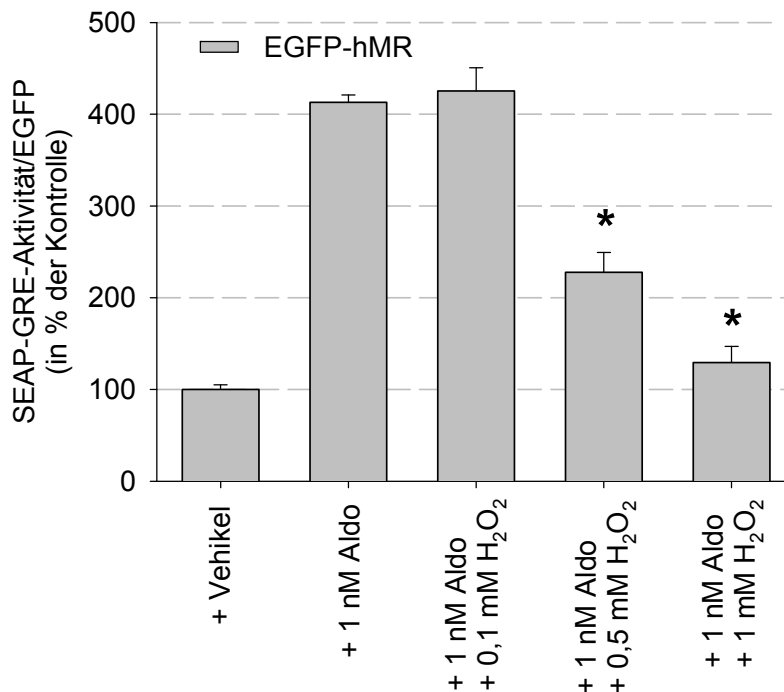
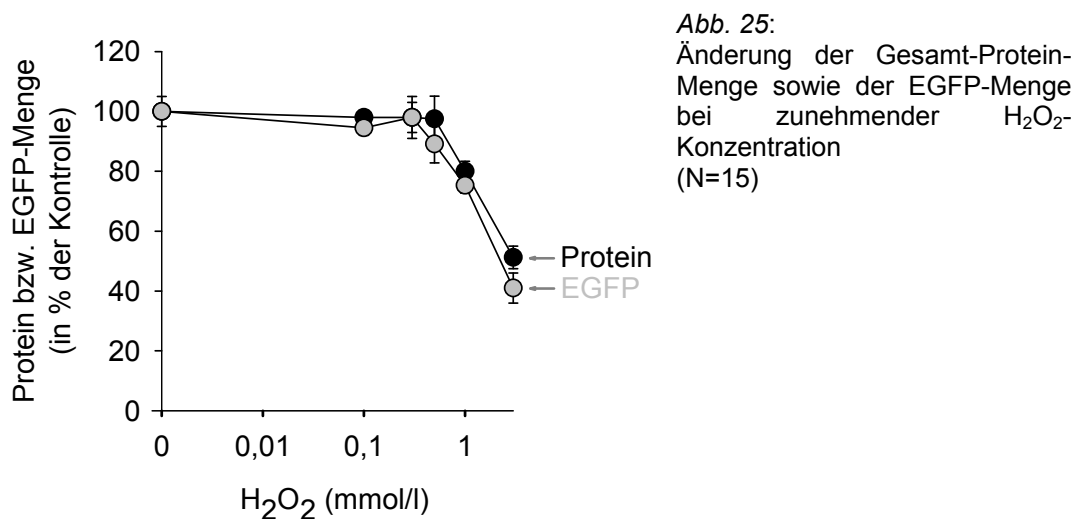


Abb. 24: Einfluss von 0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM H₂O₂ auf die Aldo-induzierte MR-Aktivierung (N=16-22)

Dass es sich bei der Herunterregulierung der GRE-SEAP-Aktivität allerdings nicht um einen unspezifischen, die gesamte Proteinsynthese betreffenden Effekt des Hydrogenperoxids handelt, zeigen folgende Ergebnisse und Überlegungen:

Erstens: Wie aus Abb. 25 ersichtlich nehmen die Proteinmenge und auch die EGFP-Menge der mit H₂O₂ inkubierten Zellen tendentiell mit Steigerung der H₂O₂-Konzentration ab; diese tendentielle Abnahme ist aber bis zu einer Konzentration von 1 mmol/l nicht signifikant.



Als Einschränkung muss an dieser Stelle aber noch darauf hingewiesen werden, dass 1 mM H₂O₂ durchaus in der Lage war, toxische Effekte an unseren HEK-Zellen hervorzurufen. Während der Arbeit mit H₂O₂ fiel auf, dass verhältnismäßig oft Versuchsreihen mit Zellen, die mit 1 mM H₂O₂ inkubiert worden waren, aus der Auswertung herausgenommen werden bzw. mehrmals wiederholt werden mussten, da die Zellen zugrunde gegangen waren oder nur EGFP-Werte auf Hintergrund-Niveau aufwiesen. Die Anfälligkeit der Zellen für die toxischen Wirkungen von H₂O₂ war vor allem abhängig vom Alter der verwendeten Zell-Passage (je älter die Passage, desto empfindlicher zeigten sich die Zellen gegenüber 1 mM H₂O₂) und von dem Zusammenspiel mit anderen Substanzen, mit denen die Zellen inkubiert wurden: insbesondere die gleichzeitige Gabe von 1 mM H₂O₂ mit Cycloheximid, einem Proteinsynthesehemmer, der sonst gut von den HEK-Zellen vertragen wurde, führte in der Regel zu einem „Massensterben“ auf den wells. Diese Anmerkung ergab sich aus den täglichen Beobachtungen und Erfahrungen im Labor; statistische Tabellen können daher hierzu nicht präsentiert werden. In sämtlichen Auswertungen wurden nur die H₂O₂-„resistenten“ HEK-Zellen einberechnet.

Zweitens: Um wiederum auszuschließen, dass es sich bei der verminderten SEAP-GRE-Aktivität um einen unspezifischen Prozess handelt, wurde in zusätzlichen Experimenten unsers Labors die Aktivität zweier weiterer Reporter (AP1-SEAP und NFκB-SEAP) nach Gabe von 0,5 mM H₂O₂ gemessen (s. Abb. 26): Hier kam es zu keiner Abnahme der Aktivität der sekretorischen alkalischen Phosphatase, die basale Aktivität dieser zwei Reporter lag etwa auf Höhe der Kontrolle.

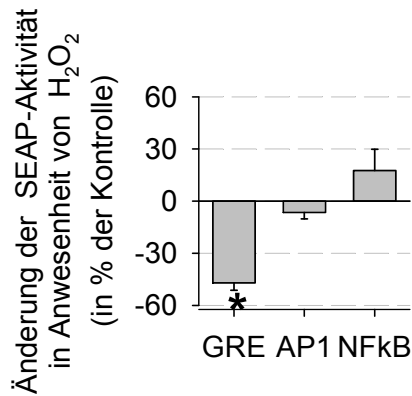


Abb. 26: H₂O₂ reguliert nur die Aktivität der *glucocorticoid response elements* herunter; die Aktivität anderer SEAP-Reporter-Konstrukte bleibt unbeeinflusst (N=6).

Drittens: In allen Grafen und Auswertungen wurde die SEAP-Aktivität stets bereinigt angegeben, d.h. relativ bezogen auf die in den Zellen produzierte EGFP- oder Proteinmenge. Sollte also die SEAP-Aktivität in einer Versuchsreihe tatsächlich auch einmal deswegen vermindert gewesen sein, weil die Zellen dieser Passage das zugeführte H₂O₂ nicht optimal vertragen haben, so fällt das rein rechnerisch nicht ins Gewicht, weil dann im Rahmen einer verminderten Proteinsynthese auch die als Bereinigungsfaktor herangezogene EGFP-Menge vermindert war.

Man kann also festhalten: H₂O₂ führt ab einer Konzentration von 0,5 mM zu einer deutlichen Abnahme der GRE-Aktivierung.

Durch eine geringere Menge an GRE-aktivierenden Rezeptoren kann diese Abnahme auch nicht erklärt werden (s. Abb. 27).

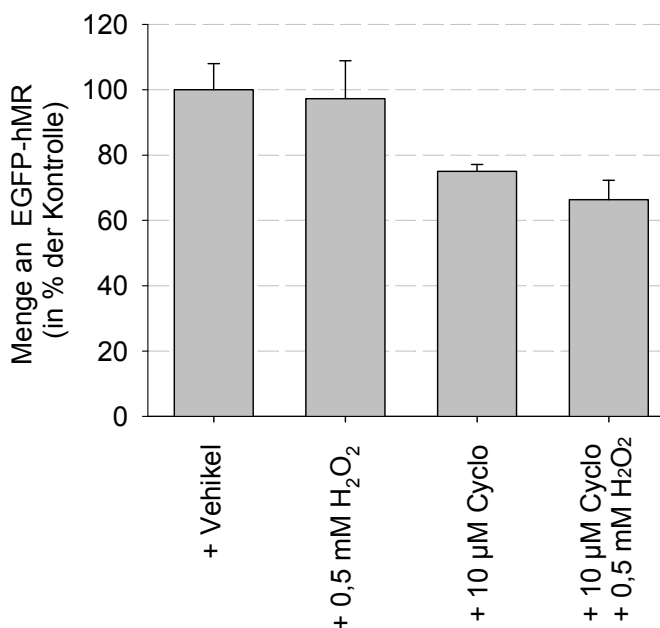


Abb. 27: Elisa: keine Änderung der EGFP-hMR-Menge/-Expression unter Einfluss von 0,5 mM H₂O₂ (mit und ohne Cycloheximid) (N=10)

3.5.2.2 Einfluss von H_2O_2 auf die Aldosteron-induzierte Transaktivierungsaktivität des MR

Aus den gegebenen Daten lässt sich die relative stimulierende Wirkung von Aldosteron auf den MR unter oxidativem Stress berechnen, d.h. man kann den stimulierenden Effekt von 1 nM Aldosteron in An- und Abwesenheit von H_2O_2 miteinander vergleichen.

Der relative stimulierende Effekt von Aldosteron liegt in Abwesenheit von Aldosteron bei ca. 4 und hielt sich nach Gabe von 0,5 und 1 mM H_2O_2 konstant in diesem Größenbereich.

Insgesamt bleibt also der relativ stimulierende Effekt von Aldosteron auch in Anwesenheit von H_2O_2 konstant, d.h. die Affinität von Aldosteron zum MR bzw. die Wirkstärke des Aldosteron-aktivierten MR ändert sich auch unter Bedingungen von oxidativem Stress nicht (Abb. 28).

Auch die relative Dexamethason- und Hydrocortison-induzierte Transaktivierungsaktivität des MR ändert sich durch Zugabe von Radikalen nicht, sondern pendelt sich bei beiden auf ein stabiles Niveau ein. Für Dexamethason liegt dieser relative stimulierende Effekt ca. beim Faktor 2, für Hydrocortison leicht über 2 (s. Abb. 29-30).

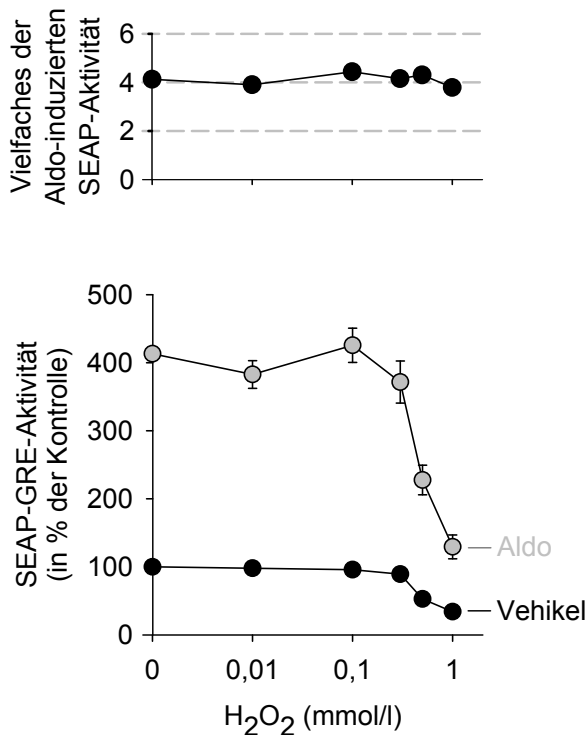


Abb. 28:
relative Aldosteron-
Wirkung bei zunehmender
 H_2O_2 -Konzentration (N=6-12)

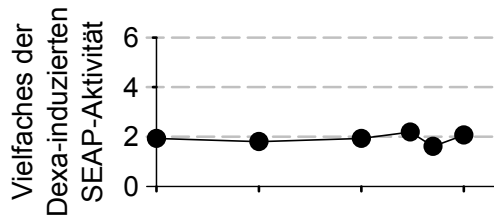


Abb. 29:
relative Dexamethason-
Wirkung bei zunehmender
H₂O₂-Konzentration (N=6-9)

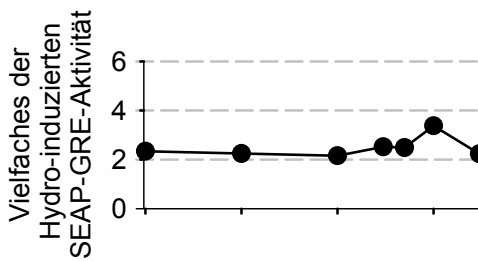
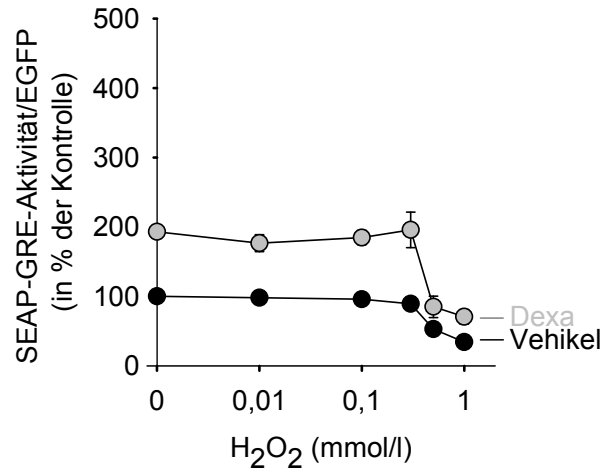
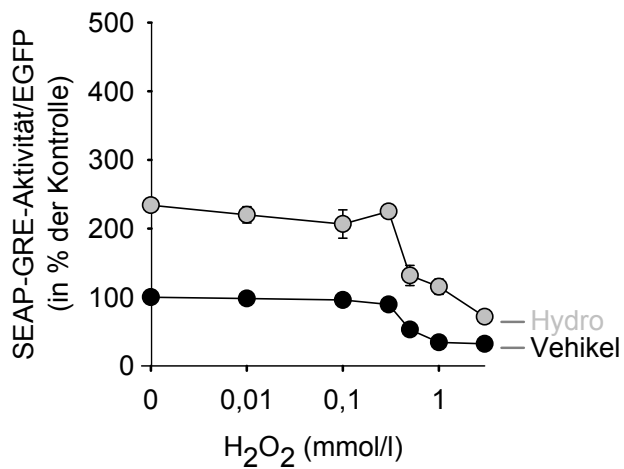


Abb. 30:
relative Hydrocortison-
Wirkung bei zunehmender
H₂O₂-Konzentration (N=6-12)



3.5.3 Einfluss von H₂O₂ auf den Transport des MR in den Nukleus

Um die einfache Möglichkeit auszuschließen, dass die GRE-SEAP-Aktivität durch H₂O₂ möglicherweise einfach dadurch herunterreguliert wird, dass der MR oder der GR in Gegenwart von H₂O₂ nicht mehr in der Lage ist, vom Zytoplasma in den Kern zu wandern, wurde folgendes Experiment durchgeführt (wobei stellvertretend der MR benutzt wurde):

HEK-Zellen wurden mit EGFP-hMR transfiziert und anschließend 24 Stunden inkubiert (je nach Versuch mit Vehikel, 1 nM Aldosteron oder 0,5 mM H₂O₂). Die Lokalisation des MR innerhalb der Zellkompartimente konnte daraufhin im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden

a) Lokalisation des EGFP-hMR in Abwesenheit von H₂O₂

Das Ergebnis war wie zu erwarten: In Zellen, die lediglich mit Vehikel inkubiert worden waren, also in Abwesenheit von Aldosteron, befand sich der EGFP-hMR zum Großteil (84,2 %) im Zytoplasma, und nur zu 5,3 % ausschließlich im Kern. In Gegenwart von Aldosteron wanderte der MR (und mit ihm eben auch das an den hMR gekoppelte EGFP) in den Kern, so dass 92% der Zellen einen leuchtenden Kern aufwiesen; in 8% der Zellen hatte sich der fluoreszierende MR ubiquitär verteilt (s. Abb. 31 u. 32).

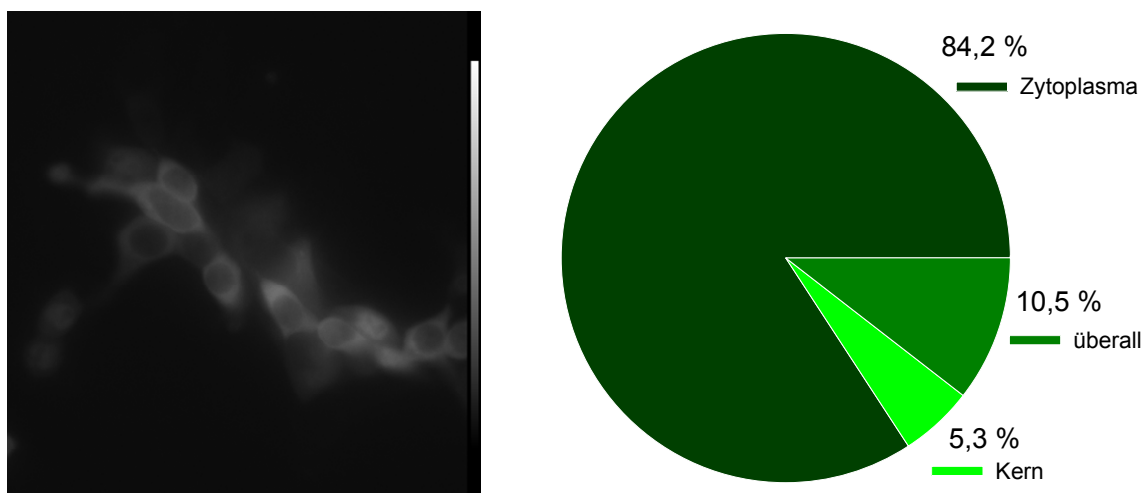


Abb. 31: Verteilung des EGFP-hMR in den Zellkompartimenten – ohne zusätzliche Stimulation, nur Zugabe von Vehikel (N=20)

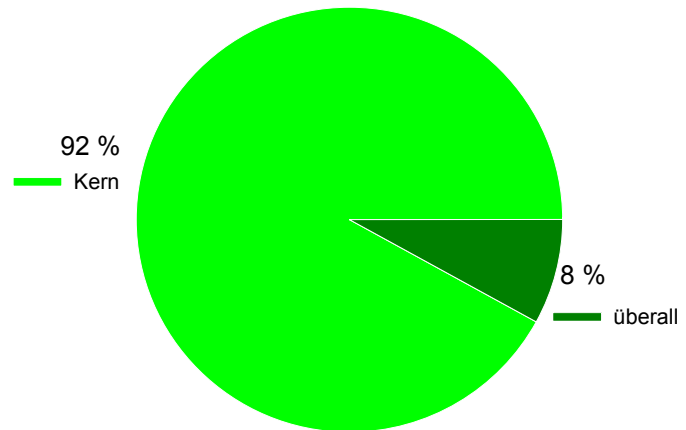
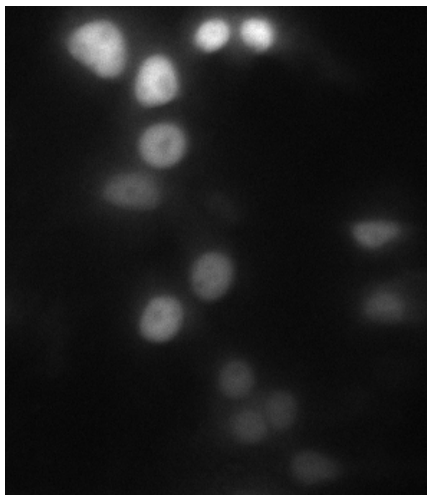


Abb. 32: Verteilung des EGFP-hMR innerhalb der Zellkompartimente nach Zugabe von Aldosteron (N=20)

b) Lokalisation des EGFP-hMR in Anwesenheit von H₂O₂

Zellen, die ausschließlich mit H₂O₂ inkubiert worden waren, zeigten bereits ohne Zugabe von Aldosteron eine mehr Kern-konzentrierte Verteilung des EGFP-hMR: H₂O₂ allein bewirkte bereits, dass sich in 63,6 % der Zellen der MR ausschließlich im Kern befand, in 18,2 % der Fälle ubiquitär verteilt, d.h. im Zytoplasma und Kern gleichermaßen verteilt. Bei gleichzeitiger Gabe von H₂O₂ und Aldosteron sieht die Verteilung des MR so aus: zu 83,33 % ausschließlich im Kern, zu 12,5 % sowohl im Kern als auch im Zytoplasma (Abb. 33 u. 34).

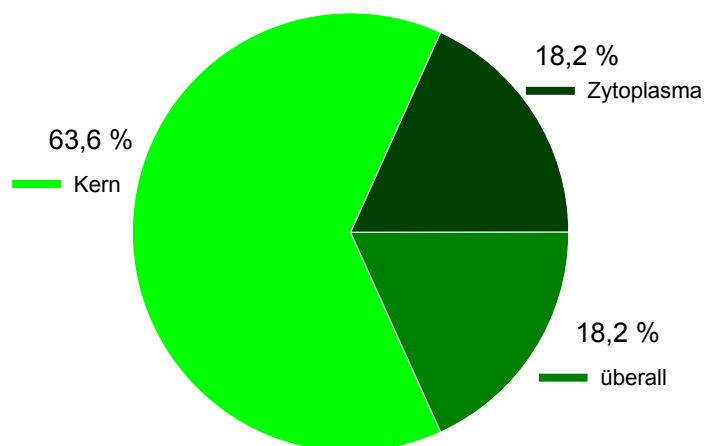
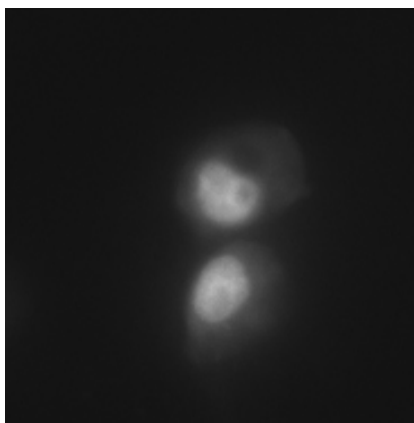


Abb. 33: Verteilung des EGFP-hMR innerhalb der Zellkompartimente nach Zugabe von 0,5 mM H₂O₂ (kein Aldo) (N=22)

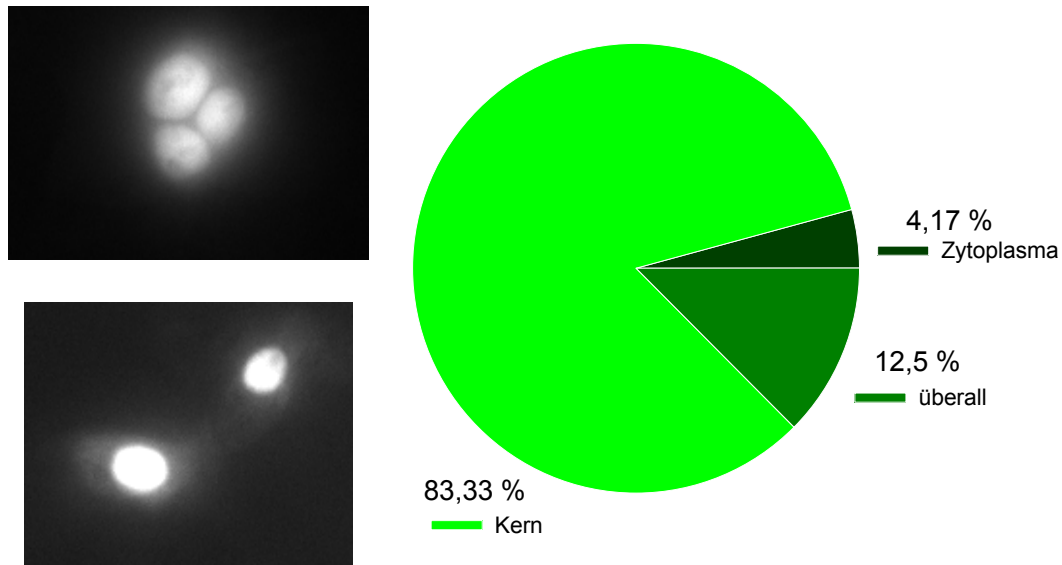


Abb. 34: Verteilung des EGFP-hMR innerhalb der Zellkompartimente in Anwesenheit von 1 nM Aldo + 0,5 mM H₂O₂ (N=24)

Die Ergebnisse zeigen, dass H₂O₂ auf alle Fälle schon mal nicht den Aldosteron-induzierten Transport des MR in den Zellkern vermindert, denn auch in Gegenwart von H₂O₂ ist bei einem Großteil der Aldosteron-inkubierten Zellen der EGFP-hMR im Nukleus lokalisiert. Eine inhibierende Einflussnahme von H₂O₂ auf den Transport des MR zwischen den Zellkompartimenten kann somit ausgeschlossen werden. Hingegen überrascht die Tatsache, dass H₂O₂ per se, d.h. ohne Zugabe von Aldosteron, scheinbar den Transport des MR in den Nukleus hinein initiieren kann.

3.5.4 Einfluss von Aldosteron auf den Redox-Haushalt der Zelle

Bisher wurde vor allem die Frage gestellt, welchen Einfluss der Redox-Haushalt einer Zelle auf die MR-Funktion der Zelle hat.

Diese Fragestellung kann man auch umkehren, nämlich: Beeinflusst die Tätigkeit des MR bzw. des Aldosterons eventuell den Redox-Haushalt der Zelle?

Um dieser Frage zumindest im Ansatz nachzugehen, wurden HEK-Zellen in 24-well-plates angesät und mit pcDNA oder EGFP-hMR transfiziert. Nach Zugabe von Aldosteron (entweder als 24-Stunden-Inkubation oder als Akut-Gabe unmittelbar vor der eigentlichen Radikalmessung) wurde die Menge an H₂O₂ in den wells mit Hilfe von H₂DCFDA am Fluoreszenzmesser bestimmt. Während mit H₂DCFDA-AM speziell die intrazelluläre H₂O₂-Konzentration gemessen werden kann (gute

Membrangängigkeit des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen Acetomethylester-Rest, s. Kap. 2 „Material und Methoden“), erfasst man mit H₂DCFDA primär die extrazelluläre H₂O₂-Konzentration (aufgrund des fehlenden Acetomethylester-Restes ist H₂DCFDA nur bedingt membrangängig), teilweise aber auch den intrazellulären H₂O₂-Gehalt (da natürlich auch einige Moleküle H₂DCFDA die Zellmembran ohne besondere Lipophilieeigenschaften durchdringen können).

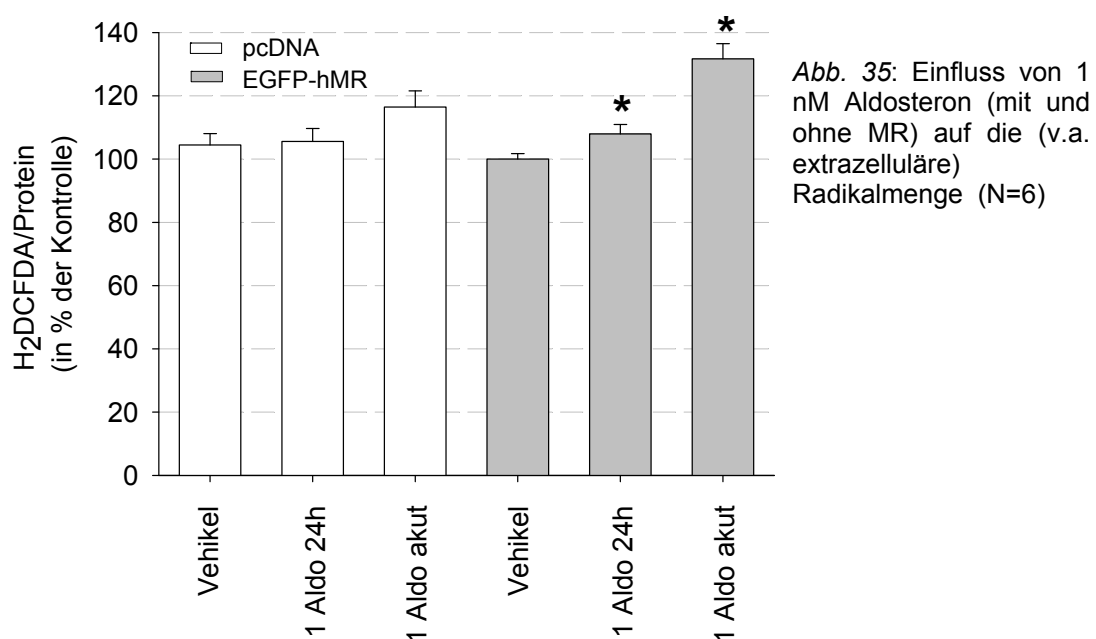
Als Vergleichsbasis für die radikale Grundaktivität der HEK-Zellen wurden die Werte pcDNA-transfizierter Zellen nach Inkubation mit Vehikel herangezogen.

Reine Gabe von 1 nM Aldosteron (sei es nach 24-h-Inkubation oder sei es als Akut-Gabe) zu den pcDNA-transfizierten Zellen bewirkte keine Änderung der mit H₂DCFDA erfassbaren Radikalmenge.

Auch die bloße Anwesenheit des MR in den Zellen (keine Aldo-Gabe, nur Vehikel) führte nicht zu einer Änderung des Redoxhaushaltes.

Erst die Kombination aus MR und 1nM Aldosteron ließ die messbare H₂O₂-Konzentration leicht, jedoch signifikant steigen. Während die Zunahme der Radikale nach 24-h-Inkubation mit 1 nM Aldo nur knapp signifikant war, war die Zunahme der Radikale nach akuter Gabe von 1 nM Aldosteron zu MR-transfizierten Zellen hochsignifikant ($\alpha < 1\%$), allerdings war die Zunahme insgesamt eher gering ausgeprägt (s. Abb. 35).

Dies ist völlig vereinbar mit bereits in der Einleitung mehrfach erwähnten Hinweisen darauf, dass Aldosteron/MR-Aktivierung zur Radikal-Bildung führen kann (3;114).



4. Diskussion

4.1 Einfluss der intrazellulären Calcium-Konzentration auf die Aldosteron-abhängige hMR-Transaktivierungsaktivität

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die intrazelluläre Calcium-Konzentration die Aldosteron-induzierte Transaktivierungsaktivität des hMR moduliert. Hierbei führt eine Erhöhung der Calcium-Konzentration zu einer Senkung der hMR-Aktivität; wie erwartet hat dementsprechend eine Senkung der intrazellulären Calcium-Konzentration eine Erhöhung der hMR-Aktivität zur Folge.

Es ist bekannt, dass Aldosteron per se in verschiedenen Zelltypen eine Erhöhung des intrazellulären Calciums hervorruft (86;94), darunter auch in HEK-Zellen, also auch in dem hier verwendeten Zelltyp (89). Dies legt die Vermutung nahe, dass Calcium im Sinne einer negativen Rückkopplung als Co-Signal bei der Regulation der Aldosteron-induzierten hMR-Aktivierung fungiert und somit daran beteiligt ist, eine überschießende MR-Aktivierung zu verhindern.

Genausogut können über Calcium aber auch andere Botenstoffe, die Calcium zur Signaltransduktion nutzen, Einfluss auf die Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung nehmen.

Diese letzten Überlegungen stellen allerdings nur einige Interpretationsmöglichkeiten der hier gewonnenen Ergebnisse dar; die experimentelle Sicherung dieser denkbaren Möglichkeiten steht leider noch aus; der genaue Mechanismus der vorgeschlagenen negativen Rückkopplung ist ebenfalls noch nicht geklärt bzw. bewiesen.

4.2 Einfluss der Proteinkinase C auf die Aldosteron-abhängige hMR-Transaktivierungsaktivität

Um den Einfluss der Proteinkinase C auf die Aldosteron-induzierte Transaktivierungsaktivität des hMR zu messen, wurde die Aktivität der Proteinkinase C in unseren Experimenten zunächst inhibiert, dann stimuliert. Keine dieser Manipulationen führte zu einer Änderung der Transkriptionsaktivität des hMR.

Bisherige Ergebnisse anderer Labore bezüglich der Rolle der PKC bei der Modulation der MR-Transaktivierungsaktivität führten zu keinem einheitlichen

Ergebnis. So konnte LeMoellic zeigen, dass PKC α in der Lage ist, die Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung in den Zellen des Sammelrohres der Ratte zu modulieren (100).

In einer anderen Untersuchung, die an Zellen des proximalen Tubulus des Schweins vorgenommen wurde, konnte kein Effekt von PKC-Stimulatoren auf die Hydrocortison-induzierte MR-Aktivität hervorgerufen werden (133).

Zum einen lassen sich diese unterschiedlichen Ergebnisse mit der Gewebe- und Zellspezifität von Signaltransduktionswegen erklären; zum anderen existiert eine Vielzahl an Subgruppen und Isoformen von PKCs (103). Der beispielsweise in unserem Labor verwendete Inhibitor BIM inhibiert die Isoenzyme PKC α , β _I, β _{II}, γ , δ und ϵ (vgl 3.3.1).

Dies ist bereits ein breites Spektrum, doch bleiben trotz alledem die Isoenzyme PKC η , θ , ζ sowie λ in unseren Experimenten unberücksichtigt.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss v.a. auf die genomische MR-Wirkung untersucht, während LeMoellic, der ja durchaus eine Interaktion zwischen der PKC α und dem Aldo-MR-Signalweg sieht, sowohl die nicht-genotropen als auch die genomischen Wirkungen betrachtet hat (Beteiligung der PKC α am schnellen Aldosteron-induzierten Na⁺-Einstrom) (100).

In Zusammenschau aller Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die PKC keine allzu zentrale Rolle spielt bei der Regulierung der Transaktivierungsaktivität des MR. Dies schließt aber nicht aus, dass die PKC abhängig vom Zelltyp durchaus modulierend in die MR-Aktivierung eingreifen kann oder dass der PKC-Signalweg gekoppelt an andere Signalwege (z.B. an den von Angiotensin II) mit den MR-vermittelten Effekten interagieren kann. Ebenso ist die Beteiligung von vielleicht nur einer oder von zwei ausgewählten PKC-Isoformen denkbar. Dazu sind aber weitere Untersuchungen nötig.

4.3 Einfluss der PI-3-Kinase auf die Aldosteron-abhängige hMR-Transaktivierungsaktivität

Sowohl schnelle nicht-genotrope als auch langsame genomische Aldosteron-Wirkungen werden von der PI-3-Kinase beeinflusst; speziell an der Aldosteron-vermittelten Na⁺-Aufnahme in die Epithelzellen soll die PI-3-Kinase beteiligt sein (47). Da außerdem die PI-3-Kinase auch involviert ist in Insulin-abhängige Prozesse

(110), gilt die PI-3-Kinase als das zentrale Schlüsselenzym, über das Insulin und Aldosteron interagieren (47). Die Verzahnung von Aldosteron und Insulin, insbesondere im pathophysiologischen Sinne im Rahmen eines Diabetes, ist evident: so fördert beispielsweise ein Aldosteron-Exzess die Entstehung/Entwicklung einer Insulin-Resistenz (134).

In unseren Experimenten wurde nun untersucht, ob die direkte Hemmung der PI-3-Kinase einen Effekt auf die genomische Wirkung des hMR hat. Dazu wurden der irreversible Inhibitor Wortmannin und der reversible Inhibitor LY294002 verwendet. Wortmannin ist hierbei ein unspezifischer Inhibitor, der nicht nur die PI-3-Kinase, sondern auch z.B. die Myosin-Leichtkettenkinase hemmt (135-137).

Die Hemmung der PI-3-Kinase durch LY294002 beeinflusste die hMR-Transaktivierungsaktivität in keiner Weise. Jedoch führte die Hemmung der PI-3-Kinase durch Wortmannin zu einer signifikanten Hemmung der Grundaktivität an GRE-SEAP. Welcher Mechanismus dieser Hemmung zugrunde liegt, wurde nicht weiter untersucht.

Dass eine direkte Hemmung der PI-3-Kinase automatisch und in jedem Falle zu einer Aldosteron-induzierten Steigerung der genomischen MR-Aktivität führt, lässt sich in diesen Untersuchungen allerdings ausschließen, da die Gabe von LY294002 keinerlei Effekt hervorgerufen hat.

4.4. Einfluss von H₂O₂ auf den MR

4.4.1 Einfluss von H₂O₂ auf die Aldosteron-abhängige hMR-Transaktivierungsaktivität

Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, spielt H₂O₂ eine zentrale Rolle bei unzähligen Stoffwechselprozessen.

In dieser Arbeit wurde die mögliche Wirkung von H₂O₂ auf die Aldosteron-induzierte hMR-Transaktivierungsaktivität untersucht.

Bis zu einer H₂O₂-Konzentration von 500 µmol/l können die HEK-Zellen ihre ROS-Homöostase aufrechterhalten; ab einer Zugabe von > 500 µmol/l H₂O₂ dekompenziert der ROS-Haushalt der HEK-Zelle (128). Diese Dekompensation geht einher mit einer erhöhten Anzahl von Zelltod in den Kolonien und auch mit einer scheinbaren Abnahme der EGFP- und Proteinbiosynthese, die sich aber in den für

diese Arbeit durchgeführten Experimenten als nicht signifikant herausstellte. Gleichzeitig führt aber die Gabe von $> 500 \mu\text{mol/l H}_2\text{O}_2$ zu einer definitiv signifikanten Abnahme der SEAP-GRE-Aktivität, und zwar bereits unter nicht-stimulierten Bedingungen, d.h. in Abwesenheit eines GRE-aktivierenden Hormons. Die in dieser Arbeit unter Abschnitt 3.5.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die relative Wirkstärke der verwendeten Hormone (Aldosteron, Hydrocortison, Dexamethason) in Gegenwart von H_2O_2 unverändert bleibt; d.h. wenn Aldosteron die SEAP-GRE-Produktion in Abwesenheit von H_2O_2 ca. verdreifacht, so verdreifacht sie die SEAP-GRE-Produktion auch noch in Anwesenheit von H_2O_2 , ausgehend von der basalen Netto-SEAP-GRE-Produktion.

Daraus folgt, dass H_2O_2 eigentlich nicht die Hormonwirkung per se bzw. die Wirkung des jeweiligen Hormons am Rezeptor bzw. die Affinität von Hormon zum MR beeinflusst, sondern dass die Einflussnahme von H_2O_2 auf das SEAP-GRE-Konstrukt wesentlich früher stattfinden muss, z.B. bei der Synthese des GRE-Elementes an sich.

Man könnte zum Beispiel annehmen, dass das GRE-Element aus noch ungeklärten Gründen einfach wesentlich empfindlicher auf die zytotoxische Wirkung von H_2O_2 reagiert.

Relativierend muss allerdings noch hinzugefügt werden, dass es für die Ausfüllung seiner Rolle als Botenstoff entscheidend ist, ob H_2O_2 exogen zugeführt wurde bzw. endogen entstanden ist: exogen zugeführt ist H_2O_2 nämlich längst nicht so effektiv als Signalmolekül wie endogen produziertes H_2O_2 (138).

Um also den tatsächlichen Einfluss von H_2O_2 auf die Hormon-induzierte MR-Aktivierung zu untersuchen, müsste man also nicht nur einfach H_2O_2 von außen zuführen, sondern stattdessen die intrazellulären Stoffwechselverhältnisse derart beeinflussen, dass es zu einem endogen provozierten ROS-Exzess kommt, z.B. durch Glutathion-Depletion oder durch Hyperglykämie-Exzess (139).

Interessant ist die Downregulierung der GRE-Aktivität unter oxidativem Stress vor allem, wenn man eine der ursprünglichen Überlegungen bedenkt, wegen derer überhaupt erst eine Beeinflussung der SEAP-GRE-Aktivität durch Radikale in Betracht gezogen wurde:

So postulierte J.W. Funder eine Einflussnahme von ROS auf die Aktivität von MR-Kortisol bzw. MR-Kortikosteron-Komplexen, da ja bei der Umwandlung des MR-

affinen Kortisols in das am MR inaktive Kortison durch die 11- β -HSD auch NAD^+ und NADH/H^+ eine Rolle nach unten angegebenem Schema spielen (13;42;72):

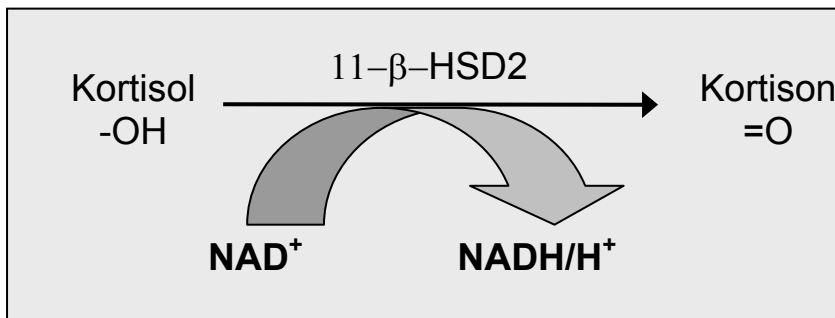


Abb. 36:
 NAD^+ -abhängige
Umwandlung von
Kortisol in Kortison

Die Konzentration von NAD^+ ist hierbei ca. 700mal größer als die Konzentration von NADH/H^+ ; Funder postuliert nun, dass ein relativ hoher NADH/H^+ -Spiegel (bei normaler Funktion der 11- β -HSD2) inhibierend auf die MR-Aktivität bzw. speziell auf die Aktivität von Glukokortikoid-MR-Komplexen wirken müsste (42). Laut dieser These müsste eine Zunahme von ROS, welche das Verhältnis NAD^+/NADH zu Gunsten von NAD^+ verschiebt, zu einer zunehmenden Anzahl von aktiven Kortisol-MR-Komplexen und somit ebenfalls zu einer zunehmenden unphysiologischen MR- und GRE-Aktivierung führen, mit all den eventuell pathologischen Folgen, die uns bisher bekannt sind (Fibrose, Inflammation etc.).

Allerdings steht diese Hypothese mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen nicht ganz im Einklang, da bei unseren Ergebnissen die Zunahme von ROS nicht zu einer Zunahme der GRE-Aktivität (und zwar die GRE-Aktivität insgesamt, nicht nur die MR-induzierte GRE-Aktivität) führte, sondern im Gegenteil zu einer deutlichen völlig Hormon-unabhängigen Herunterregulierung.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse beleuchten aber nur einen kleinen Ausschnitt der möglichen Überschneidungen von ROS auf der einen und dem MR auf der anderen Seite, immerhin sind die Interaktionsmöglichkeiten von ROS und der MR-Aktivierung äußerst vielfältig: so sollte man nicht nur die mögliche Einflussnahme von H_2O_2 auf die MR-Aktivierung im Auge haben, sondern umgekehrt auch die Aktivierung H_2O_2 -gesteuerter Prozesse durch inadäquate MR-Aktivierung.

Schon in der hier benutzten Versuchsanordnung konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von 1 nM Aldosteron (Messung akut und nach 24-h-Inkubation) in EGFP-

hMR-transfizierten Zellen die durch H₂DCFDA messbare Radikalmenge signifikant anstieg. Der einzige Umstand, der diese Messung relativiert, ist die leider nur sehr geringe Anzahl an in diesem Falle durchgeführten Messungen (N=6).

Des Weiteren konnten in anderen Experimenten nachgewiesen werden, dass Aldosteron in der Lage ist, die durch H₂O₂-induzierte Kollagenbildung in glatten Gefäßmuskelzellen der menschlichen Aorta zu potenzieren (140).

Außerdem deuten weitere Ergebnisse darauf hin, dass inadäquate MR-Aktivierung (z.B. durch Corticosteron und gleichzeitige Gabe eines 11-β-HSD2-Inhibitors) oxidative Entzündungsprozesse triggert (z.B. durch verminderte Synthese von eNOS) (141).

Nicht zuletzt sei noch erwähnt, dass es Hinweise darauf gibt, dass ROS in Nicht-Nebennieren-Geweben die Aldosteron-Produktion stimulieren könnten (142).

Die Verzahnung des Redox-Haushaltes einer Zelle mit dem Aldo/MR-Signalweg ist also vielfältiger als man denkt – die Auswertung nur eines einzigen Versuchsmodells lässt letztendlich keinen endgültigen Schluss/keine endgültige Interpretation zu.

4.4.2 Einfluss von H₂O₂ auf die Lokalisation des EGFP-hMR

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von H₂O₂ auf den Transport des MR innerhalb der Zellkompartimente untersucht.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die verminderte GRE-Aktivität in Gegenwart von H₂O₂ schon mal nicht durch eine Hemmung des Transports des MR in den Nukleus beeinträchtigt wird. Im Gegenteil, was stattdessen ein wenig überrascht, ist die Tatsache, dass H₂O₂ per se, also ohne Zugabe von Aldosteron, in der Lage zu sein scheint, einen Transport des MR in den Kern zu initiieren. Dieses Phänomen lässt einige Spekulationen zu: so könnte beispielsweise H₂O₂ eine Dissoziation des MR von seinem „Wächter“, dem Hsp90, bewirken und so zu einem freien Wandern des MR innerhalb der Zelle führen; vielleicht aber macht das Radikal H₂O₂ auch nur die Kernmembran ein wenig „poröser“, was nicht nur zu einer größeren Ansammlung des MR im Kern führen würde, sondern auch andere Proteine betreffen würde. Wie schon gesagt, es gibt für dieses genannte Phänomen sicherlich eine Menge Erklärungsmöglichkeiten, eine Antwort darauf kann nur anhand der hier vorgestellten Ergebnisse nicht gegeben werden, sondern müsste in weiteren Arbeiten untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Signaltransduktionswege auf die Aldosteron-induzierte Transaktivierungsaktivität des Mineralokortikoidrezeptors zu untersuchen. Bei den hierzu ausgewählten Signalwegen handelte es sich um Calcium, Proteinkinase C, die PI-3-Kinase sowie um H_2O_2 .

1. Calcium reguliert hierbei die Aldosteron-induzierte hMR-Aktivität im negativen Sinne, d.h. Zugabe von Calcium führt zur Abnahme der Aldosteron-abhängigen hMR-Aktivität. Da die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zu den schnellen Aldosteron-Effekten gehört (wie bereits mehrfach in dieser Arbeit erläutert), könnte diese Calcium-abhängige Herunterregulierung der hMR-Aktivität als ein negativer Feedback-Mechanismus interpretiert werden.

2. Weder Hemmung noch Aktivierung der Proteinkinase C konnte eine Änderung der Aldosteron-abhängigen hMR-Aktivität in unseren Experimenten hervorrufen.

3. Was die Beeinflussung der hMR-Aktivität durch die PI-3-Kinase betrifft, so waren die Ergebnisse nicht einheitlich zu interpretieren. Die reversible, spezifische Hemmung durch LY294002 führte zu keiner Änderung der hMR-Aktivität. Die irreversible unspezifische Hemmung durch Wortmannin führte zu einer generellen Downregulierung der GRE-SEAP-Aktivität, und zwar sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Aldosteron. Weitere Experimente zur Klärung dieses Phänomens stehen noch aus, letztlich sprechen die soweit gewonnenen Ergebnisse eher weniger für eine direkte Beteiligung der PI-3-Kinase an der Modulation der hMR-Aktivität.

4. Zugabe von H_2O_2 führt ab einer Konzentration von $> 500 \text{ mol/l } H_2O_2$ zu einer generellen Herunterregulierung der hMR-Aktivität. Diese H_2O_2 -induzierte Abnahme der hMR-Aktivität ist Hormon-unabhängig, d.h. sie findet in Gegenwart und auch in Abwesenheit stimulierender Hormone (Aldosteron, Hydrocortison, Dexamethason) statt. Die relative stimulierende Wirkung dieser Hormone am hMR bleibt auch in Anwesenheit von H_2O_2 gleich, d.h. H_2O_2 scheint zumindest nicht die Wirkweise der Hormone per se oder deren Affinität zum MR hin zu beeinflussen. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass H_2O_2 per se, also unabhängig von Aldosteron, den Transport des MR in den Zellkern zu initiieren vermag.

FAZIT: In unseren Experimenten übte Calcium einen signifikanten Einfluss auf die Aldosteron-induzierte hMR-Aktivität aus.

Für die PKC und die PI-3-Kinase konnte ein solcher klarer, evidenter Einfluss auf die MR-Aktivierung nicht nachgewiesen werden.

H₂O₂ senkt die Transkriptionsaktivität des GRE-Elementes, sowohl die hMR-induzierte als auch die nicht-hMR-induzierte. Diese Abnahme der Transaktivierungsaktivität ist dabei völlig Hormon-unabhängig.

Über welche Mechanismen Calcium und H₂O₂ ihre Effekte bezüglich hMR/SEAP-GRE-Aktivität ausüben, ist aber noch nicht geklärt.

6. Ausblick

Die zahlreichen (v.a. pathophysiologischen) Effekte, die Aldosteron hervorzurufen vermag, und die Signalwege, mit denen Aldosteron zu interagieren vermag, liegen mit Sicherheit noch zum Großteil im Dunkeln.

Diese Arbeit wollte lediglich einen kleinen Baustein des Bauwerks „Aldosteron und MR-Aktivierung“ etwas genauer beleuchten.

Letztlich wurden in dieser Arbeit nur Calcium, Proteinkinase C, die PI-3-Kinase sowie H₂O₂ betrachtet. Mit Sicherheit ist aber eine Interaktion des MR mit theoretisch jedem anderen bekannten (und auch unbekanntem) Signalmolekül möglich, man denke hierbei nur an sämtliche anderen Proteinkinasen, Phosphatasen etc. sowie an die Interaktion mit anderen Rezeptoren, z.B. dem EGF-Rezeptor (98).

Die wichtigste Frage, die vor allem die Forschungsarbeiten in Zukunft betrifft, bleibt aber: inwiefern besitzen diese Modulationen und Interaktionen von verschiedenen Signalwegen tatsächlich eine (patho-)physiologische Relevanz?

Es ist mittlerweile bekannt, dass es zu einem Crosstalk zwischen genomischer und nicht-genotroper Wirkung des MR kommt – nach wie vor bleibt aber ungeklärt, ob dieser Crosstalk letztlich physiologischen oder pathophysiologischen Zielen zugute kommt (143).

Kommen die künstlichen Milieuänderungen, die u.U. zu einer Änderung der MR-Aktivierung führen, überhaupt *in vivo* vor und könnten diese somit tatsächlich auch im lebenden Objekt eine Rolle spielen?

Und welche der verschiedenen beschriebenen Interaktionen führt über lange Prozesse zu den klinisch relevanten Ereignissen wie Arteriosklerose, endotheliale Dysfunktion, Herzinsuffizienz, Niereninsuffizienz etc.?

D.h. wo liegen die entscheidenden Knotenpunkte im Aldosteron-MR-System, die man durch entsprechende pharmakologische Manipulation gezielt auflösen könnte, damit das vielgesichtige Aldosteron, *the good, the bad and the ugly* (44), sich wieder ganz auf seine guten Seiten „besinnen“ kann?

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AF	activation function
Aldo	Aldosteron
AS	Aminosäure
BIM	Bisnolylmaleimid
Cyclo	Cycloheximid
DAG	Diacylglycerol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
Dexa	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOG	Diocetylglycerol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFG	epidermal growth factor
EFGR	epidermal growth factor receptor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immunosorbed assay
ENaC	epithelialer Natriumkanal
ERK	extracellular signal regulated kinase
Fura-2-AM	Fura-2-Acetomethylester
GILZ	glucocorticoid leucine zipper protein
GR	Glucokortikoidrezeptor
GRE	glucocorticoid response element
HEK	human embryonic kidney
hMR	humaner Mineralokortikoidrezeptor
HRE	hormone response element
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
hsp	heat shock protein (Hitzeschockprotein)
Hydro	Hydrocortison
ICCD	intensified charge-coupled device (camera)

Iono	Ionomycin
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MAP	mitogen activated protein
MR	Mineralokortikoidrezeptor
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NTD	N-terminale Domäne
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PDK-1	3-phosphoinositide-dependant protein kinase-1
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
ROS	reactive oxygen species
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SEM	Standardfehler
SR	Steroidrezeptor
TGF β	transforming growth factor β
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Literaturverzeichnis

Reference List

1. **Williams JS, Williams GH** 2003 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2364-2372
2. **Rocha R, Stier CT, Jr.** 2001 Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues
1. *Trends Endocrinol Metab* 12:308-314
3. **Hollenberg NK** 2004 Aldosterone in the development and progression of renal injury
1. *Kidney Int* 66:1-9
4. **Epstein M** 2001 Aldosterone as a determinant of cardiovascular and renal dysfunction
2. *J R Soc Med* 94:378-383
5. **Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J** 1999 The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators
3. *N Engl J Med* 341:709-717
6. **Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M** 2003 Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction
9. *N Engl J Med* 348:1309-1321
7. **Chun TY, Pratt JH** 2004 Non-genomic effects of aldosterone: new actions and questions
4. *Trends Endocrinol Metab* 15:353-354
8. **Cato AC, Nestl A, Mink S** 2002 Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways
1. *Sci STKE* 2002:RE9
9. **Lange CA** 2004 Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word?
2. *Mol Endocrinol* 18:269-278
10. **Funder J** 2001 Mineralocorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:1002-1006
11. **Funder JW** 1987 Adrenal steroids: new answers, new questions
1. *Science* 237:236-237
12. **Funder JW** 2004 Cardiac synthesis of aldosterone: going, going, gone...?
Endocrinology 145:4793-4795

13. **Funder JW** 2006 Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology* 147:5564-5567
14. **Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ** 2004 Mineralocorticoid receptor binding, structure and function
 1. *Mol Cell Endocrinol* 217:203-212
15. **Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Foecking MF, Gomez-Sanchez EP** 1997 Aldosterone biosynthesis in the rat brain
 3. *Endocrinology* 138:3369-3373
16. **Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C** 1998 Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. *Physiological regulation*
 1. *J Biol Chem* 273:4883-4891
17. **Takeda R, Hatakeyama H, Takeda Y, Iki K, Miyamori I, Sheng WP, Yamamoto H, Blair IA** 1995 Aldosterone biosynthesis and action in vascular cells
 1. *Steroids* 60:120-124
18. **Young MJ, Clyne CD, Cole TJ, Funder JW** 2001 Cardiac steroidogenesis in the normal and failing heart
 1. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5121-5126
19. **Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C** 1999 Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis
 1. *Circulation* 99:2694-2701
20. **Rudolph AE, Blasi ER, Delyani JA** 2000 Tissue-specific corticosteroidogenesis in the rat
 1. *Mol Cell Endocrinol* 165:221-224
21. **Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE** 2004 Origin of aldosterone in the rat heart
 1. *Endocrinology* 145:4796-4802
22. **Kwak SP, Patel PD, Thompson RC, Akil H, Watson SJ** 1993 5'-Heterogeneity of the mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic acid: differential expression and regulation of splice variants within the rat hippocampus
 2. *Endocrinology* 133:2344-2350
23. **Le Menuet D, Viengchareun S, Penfornis P, Walker F, Zennaro MC, Lombes M** 2000 Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice
 1. *J Biol Chem* 275:7878-7886
24. **Zennaro MC, Keightley MC, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F, Fuller PJ** 1995 Human mineralocorticoid receptor genomic structure and identification of expressed isoforms

8. J Biol Chem 270:21016-21020
25. **Zennaro MC, Le Menuet D, Lombes M** 1996 Characterization of the human mineralocorticoid receptor gene 5'-regulatory region: evidence for differential hormonal regulation of two alternative promoters via nonclassical mechanisms. Mol Endocrinol 10:1549-1560
26. **Evans RM** 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily
2. Science 240:889-895
27. **Pascual-Le Tallec L, Lombes M** 2005 The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action
1. Mol Endocrinol 19:2211-2221
28. **Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombes M** 2007 The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology
1. Nucl Recept Signal 5:e012
29. **Bledsoe RK, Madauss KP, Holt JA, Apolito CJ, Lambert MH, Pearce KH, Stanley TB, Stewart EL, Trump RP, Willson TM, Williams SP** 2005 A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor
1. J Biol Chem 280:31283-31293
30. **Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM** 1987 Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor
1. Science 237:268-275
31. **Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ** 2003 Dissecting mineralocorticoid receptor structure and function
2. J Steroid Biochem Mol Biol 85:389-396
32. **Pratt WB, Toft DO** 1997 Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones
1. Endocr Rev 18:306-360
33. **Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FT, Sigler PB, Lifton RP** 2000 Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy
1. Science 289:119-123
34. **Rupprecht R, Arriza JL, Spengler D, Reul JM, Evans RM, Holsboer F, Damm K** 1993 Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor
1. Mol Endocrinol 7:597-603
35. **Funder JW** 1994 Enzymes and receptors: challenges and future directions. Steroids 59:164-169

36. **Lim-Tio SS, Keightley MC, Fuller PJ** 1997 Determinants of specificity of transactivation by the mineralocorticoid or glucocorticoid receptor
2. *Endocrinology* 138:2537-2543
37. **Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS** 1994 Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme
29. *Mol Cell Endocrinol* 105:R11-R17
38. **Alikhani-Koopaei R, Fouladkou F, Frey FJ, Frey BM** 2004 Epigenetic regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression
1. *J Clin Invest* 114:1146-1157
39. **Stewart PM, Corrie JE, Shackleton CH, Edwards CR** 1988 Syndrome of apparent mineralocorticoid excess. A defect in the cortisol-cortisone shuttle
15. *J Clin Invest* 82:340-349
40. **Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C** 1988 Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor
1. *Lancet* 2:986-989
41. **Funder JW, Pearce PT, Smith R, Campbell J** 1989 Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors
1. *Endocrinology* 125:2224-2226
42. **Funder JW** 2004 Is aldosterone bad for the heart? *Trends Endocrinol Metab* 15:139-142
43. **Marissal-Arvy N, Lombes M, Petterson J, Moisan MP, Mormede P** 2004 Gain of function mutation in the mineralocorticoid receptor of the Brown Norway rat
1. *J Biol Chem* 279:39232-39239
44. **Gekle M, Grossmann C** 2008 Actions of aldosterone in the cardiovascular system: the good, the bad, and the ugly? *Pflugers Arch*
45. **Odermatt A, Arnold P, Frey FJ** 2001 The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2
1. *J Biol Chem* 276:28484-28492
46. **Funder JW** 1997 Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. *Annu Rev Med* 48:231-240
47. **Booth RE, Johnson JP, Stockand JD** 2002 Aldosterone
2. *Adv Physiol Educ* 26:8-20
48. **Krozowski Z, Funder JW** 1981 Mineralocorticoid receptors in the rat lung. *Endocrinology* 109:1811-1813
49. **Pressley L, Funder JW** 1975 Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in gut mucosa

1. Endocrinology 97:588-596
50. **Sasano H, Fukushima K, Sasaki I, Matsuno S, Nagura H, Krozowski ZS** 1992 Immunolocalization of mineralocorticoid receptor in human kidney, pancreas, salivary, mammary and sweat glands: a light and electron microscopic immunohistochemical study
1. J Endocrinol 132:305-310
51. **Jorgensen PL** 1986 Structure, function and regulation of Na,K-ATPase in the kidney
8. Kidney Int 29:10-20
52. **Dempski RE, Lustig J, Friedrich T, Bamberg E** 2008 Structural arrangement and conformational dynamics of the gamma subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase
1. Biochemistry 47:257-266
53. **Feraille E, Mordasini D, Gonin S, Deschenes G, Vinciguerra M, Doucet A, Vandewalle A, Summa V, Verrey F, Martin PY** 2003 Mechanism of control of Na,K-ATPase in principal cells of the mammalian collecting duct
3. Ann N Y Acad Sci 986:570-578
54. **Kolla V, Litwack G** 2000 Transcriptional regulation of the human Na/K ATPase via the human mineralocorticoid receptor
1. Mol Cell Biochem 204:35-40
55. **Capurro C, Coutry N, Bonvalet JP, Escoubet B, Garty H, Farman N** 1996 Cellular localization and regulation of CHIF in kidney and colon
2. Am J Physiol 271:C753-C762
56. **Bhargava A, Pearce D** 2004 Mechanisms of mineralocorticoid action: determinants of receptor specificity and actions of regulated gene products
1. Trends Endocrinol Metab 15:147-153
57. **Brennan FE, Fuller PJ** 2006 Mammalian K-ras2 is a corticosteroid-induced gene in vivo
1. Endocrinology 147:2809-2816
58. **Mastroberardino L, Spindler B, Forster I, Loffing J, Assandri R, May A, Verrey F** 1998 Ras pathway activates epithelial Na⁺ channel and decreases its surface expression in Xenopus oocytes
1. Mol Biol Cell 9:3417-3427
59. **Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, Pearce D** 2005 A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport
2. J Biol Chem 280:39970-39981
60. **Kayes-Wandover KM, White PC** 2000 Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart
1. J Clin Endocrinol Metab 85:2519-2525

61. **Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP** 1995 Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart
2. *Circulation* 92:175-182
62. **Takeda Y, Miyamori I, Inaba S, Furukawa K, Hatakeyama H, Yoneda T, Mabuchi H, Takeda R** 1997 Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats
1. *Hypertension* 29:45-48
63. **McEwen BS, de Kloet ER, Rostene W** 1986 Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system
1. *Physiol Rev* 66:1121-1188
64. **Rossi G, Boscaro M, Ronconi V, Funder JW** 2005 Aldosterone as a cardiovascular risk factor. *Trends Endocrinol Metab* 16:104-107
65. **Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A** 1993 Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension
4. *Hypertension* 21:929-933
66. **Nishimura M, Uzu T, Fujii T, Kuroda S, Nakamura S, Inenaga T, Kimura G** 1999 Cardiovascular complications in patients with primary aldosteronism
1. *Am J Kidney Dis* 33:261-266
67. **Duprez DA, Bauwens FR, De Buyzere ML, De Backer TL, Kaufman JM, Van Hoecke J, Vermeulen A, Clement DL** 1993 Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension
1. *Am J Cardiol* 71:17A-20A
68. **Rocha R, Stier CT, Jr., Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK** 2000 Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy
1. *Endocrinology* 141:3871-3878
69. **Weber KT, Brilla CG** 1992 Myocardial fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system
2. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 Suppl 1:S48-S54
70. **Krug AW, Kopprasch S, Ziegler CG, Dippong S, Catar RA, Bornstein SR, Morawietz H, Gekle M** 2007 Aldosterone rapidly induces leukocyte adhesion to endothelial cells: a new link between aldosterone and arteriosclerosis?
1. *Hypertension* 50:e156-e157
71. **Oberleithner H** 2007 Is the vascular endothelium under the control of aldosterone? Facts and hypothesis
1. *Pflugers Arch* 454:187-193
72. **Funder JW** 2004 Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. *Mol Cell Endocrinol* 217:263-269
73. **Agarwal MK, Mirshahi F, Mirshahi M, Rostene W** 1993 Immunochemical detection of the mineralocorticoid receptor in rat brain

2. *Neuroendocrinology* 58:575-580
74. **Peysner K, Henry CA, Malvin RL** 1990 Central infusion of aldosterone increases blood pressure by mechanisms independent of Na retention
1. *Clin Exp Hypertens A* 12:399-414
75. **Gomez-Sanchez EP, Venkataraman MT, Thwaites D, Fort C** 1990 ICV infusion of corticosterone antagonizes ICV-aldosterone hypertension
2. *Am J Physiol* 258:E649-E653
76. **Gomez-Sanchez EP, Fort CM, Gomez-Sanchez CE** 1990 Intracerebroventricular infusion of RU28318 blocks aldosterone-salt hypertension
3. *Am J Physiol* 258:E482-E484
77. **Cooney AS, Fitzsimons JT** 1996 Increased sodium appetite and thirst in rat induced by the ingredients of liquorice, glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid
1. *Regul Pept* 66:127-133
78. **Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Welzl H, Haas HL, Lipp HP, Schutz G** 2006 Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:195-200
79. **de Kloet ER** 2003 Hormones, brain and stress
4. *Endocr Regul* 37:51-68
80. **Young EA, Lopez JF, Murphy-Weinberg V, Watson SJ, Akil H** 1998 The role of mineralocorticoid receptors in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation in humans
1. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3339-3345
81. **Losel RM, Feuring M, Falkenstein E, Wehling M** 2002 Nongenomic effects of aldosterone: cellular aspects and clinical implications
1. *Steroids* 67:493-498
82. **Losel R, Feuring M, Wehling M** 2002 Non-genomic aldosterone action: from the cell membrane to human physiology
1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:167-171
83. **Doolan CM, Harvey BJ** 1996 Rapid effects of steroid hormones on free intracellular calcium in T84 colonic epithelial cells
2. *Am J Physiol* 271:C1935-C1941
84. **Wehling M, Neylon CB, Fullerton M, Bobik A, Funder JW** 1995 Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells
7. *Circ Res* 76:973-979
85. **Winter DC, Schneider MF, O'Sullivan GC, Harvey BJ, Geibel JP** 1999 Rapid effects of aldosterone on sodium-hydrogen exchange in isolated colonic crypts
1. *J Membr Biol* 170:17-26

86. **Gekle M, Golenhofen N, Oberleithner H, Silbernagl S** 1996 Rapid activation of Na⁺/H⁺ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca²⁺ and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10500-10504
87. **Christ M, Eisen C, Aktas J, Theisen K, Wehling M** 1993 The inositol-1,4,5-trisphosphate system is involved in rapid effects of aldosterone in human mononuclear leukocytes
1. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1452-1457
88. **Manegold JC, Falkenstein E, Wehling M, Christ M** 1999 Rapid aldosterone effects on tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells
1. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 45:805-813
89. **Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildemberger S, Gassner B, Gekle M** 2005 Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* 19:1697-1710
90. **Oberleithner H, Kersting U, Silbernagl S, Steigner W, Vogel U** 1989 Fusion of cultured dog kidney (MDCK) cells: II. Relationship between cell pH and K⁺ conductance in response to aldosterone
3. *J Membr Biol* 111:49-56
91. **Mihailidou AS, Mardini M, Funder JW** 2004 Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C
1. *Endocrinology* 145:773-780
92. **Wehling M, Losel R** 2006 Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors?
1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:180-183
93. **Mihailidou AS** 2005 Nongenomic cardiovascular actions of aldosterone: a receptor for all seasons?
1. *Endocrinology* 146:971-972
94. **Losel R, Wehling M** 2003 Nongenomic actions of steroid hormones
2. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:46-56
95. **Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P** 2003 Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2231-2236
96. **Schmidt BM, Georgens AC, Martin N, Tillmann HC, Feuring M, Christ M, Wehling M** 2001 Interaction of rapid nongenomic cardiovascular aldosterone effects with the adrenergic system
1. *J Clin Endocrinol Metab* 86:761-767
97. **Krug AW, Schuster C, Gassner B, Freudinger R, Mildemberger S, Troppmair J, Gekle M** 2002 Human epidermal growth factor receptor-1 expression renders Chinese hamster ovary cells sensitive to alternative aldosterone signaling. *J Biol Chem* 277:45892-45897

98. **Grossmann C, Gekle M** 2008 Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. *Steroids* 73:973-978
99. **Krug AW, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildenerger S, Govindan MV, Gekle M** 2003 Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem* 278:43060-43066
100. **Le Moellic C, Ouvrard-Pascaud A, Capurro C, Cluzeaud F, Fay M, Jaisser F, Farman N, Blot-Chabaud M** 2004 Early nongenomic events in aldosterone action in renal collecting duct cells: PKC α activation, mineralocorticoid receptor phosphorylation, and cross-talk with the genomic response
1. *J Am Soc Nephrol* 15:1145-1160
101. **Oberleithner H** 1999 Aldosterone and nuclear signaling in kidney
5. *Steroids* 64:42-50
102. **Christ M, Wehling M** 1999 Rapid actions of aldosterone: lymphocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells
1. *Steroids* 64:35-41
103. **Parker PJ, Murray-Rust J** 2004 PKC at a glance
1. *J Cell Sci* 117:131-132
104. **Koya D, King GL** 1998 Protein kinase C activation and the development of diabetic complications
1. *Diabetes* 47:859-866
105. **Akita Y** 2002 Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. *J Biochem* 132:847-852
106. **Wu G, Toyokawa T, Hahn H, Dorn GW** 2000 Epsilon protein kinase C in pathological myocardial hypertrophy. Analysis by combined transgenic expression of translocation modifiers and Galphaq
1. *J Biol Chem* 275:29927-29930
107. **Takeishi Y, Ping P, Bolli R, Kirkpatrick DL, Hoit BD, Walsh RA** 2000 Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy
1. *Circ Res* 86:1218-1223
108. **Massaad C, Houard N, Lombes M, Barouki R** 1999 Modulation of human mineralocorticoid receptor function by protein kinase A
1. *Mol Endocrinol* 13:57-65
109. **Toker A, Cantley LC** 1997 Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase
2. *Nature* 387:673-676
110. **Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR** 1994 Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation
2. *Mol Cell Biol* 14:4902-4911

111. **Parker PJ, Waterfield MD** 1992 Phosphatidylinositol 3-kinase: a novel effector
1. *Cell Growth Differ* 3:747-752
112. **Blazer-Yost BL, Paunescu TG, Helman SI, Lee KD, Vlahos CJ** 1999
Phosphoinositide 3-kinase is required for aldosterone-regulated sodium
reabsorption
1. *Am J Physiol* 277:C531-C536
113. **Edinger RS, Rokaw MD, Johnson JP** 1999 Vasopressin stimulates sodium
transport in A6 cells via a phosphatidylinositide 3-kinase-dependent pathway
2. *Am J Physiol* 277:F575-F579
114. **Fiebeler A, Luft FC** 2005 The mineralocorticoid receptor and oxidative stress.
Heart Fail Rev 10:47-52
115. **Piwien-Pilipuk G, Ayala A, Machado A, Galigniana MD** 2002 Impairment of
mineralocorticoid receptor (MR)-dependent biological response by oxidative stress
and aging: correlation with post-translational modification of MR and decreased
ADP-ribosylatable level of elongating factor 2 in kidney cells
1. *J Biol Chem* 277:11896-11903
116. **Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A** 1997 Oxidants as stimulators of signal
transduction
1. *Free Radic Biol Med* 22:269-285
117. **Roveri A, Coassin M, Maiorino M, Zamburlini A, van Amsterdam FT, Ratti
E, Ursini F** 1992 Effect of hydrogen peroxide on calcium homeostasis in smooth
muscle cells
1. *Arch Biochem Biophys* 297:265-270
118. **Staal FJ, Anderson MT, Staal GE, Herzenberg LA, Gitler C, Herzenberg LA**
1994 Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and
calcium influx
1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3619-3622
119. **Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA** 1991 Reactive oxygen intermediates as
apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B
transcription factor and HIV-1
1. *EMBO J* 10:2247-2258
120. **Devary Y, Gottlieb RA, Smeal T, Karin M** 1992 The mammalian ultraviolet
response is triggered by activation of Src tyrosine kinases
1. *Cell* 71:1081-1091
121. **Krieger-Brauer HI, Kather H** 1992 Human fat cells possess a plasma membrane-
bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism
bypassing the receptor kinase
1. *J Clin Invest* 89:1006-1013
122. **Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T** 1995 Requirement for
generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction
2. *Science* 270:296-299

123. **Funder J, Myles K** 1996 Exclusion of corticosterone from epithelial mineralocorticoid receptors is insufficient for selectivity of aldosterone action: in vivo binding studies
1. *Endocrinology* 137:5264-5268
124. **Agarwal AK, Auchus RJ** 2005 Minireview: cellular redox state regulates hydroxysteroid dehydrogenase activity and intracellular hormone potency
1. *Endocrinology* 146:2531-2538
125. **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** 1985 A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties
1. *J Biol Chem* 260:3440-3450
126. **Rudolf R, Mongillo M, Rizzuto R, Pozzan T** 2003 Looking forward to seeing calcium
3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:579-586
127. **Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D** 1994 Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77:817-827
128. **Pfau A, Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Benesic A, Gekle M** 2007 Ca²⁺ but not H₂O₂ modulates GRE-element activation by the human mineralocorticoid receptor in HEK cells. *Mol Cell Endocrinol* 264:35-43
129. **Hecquet C, Tan F, Marcic BM, Erdos EG** 2000 Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol Pharmacol* 58:828-836
130. **Davis PD, Hill CH, Keech E, Lawton G, Nixon JS, Sedgwick AD, Wadsworth J, Westmacott D, Wilkinson SE** 1989 Potent selective inhibitors of protein kinase C
3. *FEBS Lett* 259:61-63
131. **Toullec D, Pianetti P, Coste H, Bellevergue P, Grand-Perret T, Ajakane M, Baudet V, Boissin P, Boursier E, Loriolle F, .** 1991 The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C
1. *J Biol Chem* 266:15771-15781
132. **Gekeler V, Boer R, Uberall F, Ise W, Schubert C, Utz I, Hofmann J, Sanders KH, Schachtele C, Klemm K, Grunicke H** 1996 Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on P-glycoprotein-mediated multidrug resistance
3. *Br J Cancer* 74:897-905
133. **Lim-Tio SS, Fuller PJ** 1998 Intracellular signaling pathways confer specificity of transactivation by mineralocorticoid and glucocorticoid receptors
2. *Endocrinology* 139:1653-1661
134. **Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM** 2005 The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes
3. *Trends Endocrinol Metab* 16:120-126

135. **Nakanishi S, Kakita S, Takahashi I, Kawahara K, Tsukuda E, Sano T, Yamada K, Yoshida M, Kase H, Matsuda Y, .** 1992 Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase
4. J Biol Chem 267:2157-2163
136. **Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF** 1994 A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)
4. J Biol Chem 269:5241-5248
137. **Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y, Nonomura Y, Matsuda Y** 1993 Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells
2. J Biol Chem 268:25846-25856
138. **Veal EA, Day AM, Morgan BA** 2007 Hydrogen peroxide sensing and signaling
1. Mol Cell 26:1-14
139. **Bonnefont-Rousselot D** 2002 Glucose and reactive oxygen species
1. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 5:561-568
140. **Gekle M, Mildenerberger S, Freudinger R, Grossmann C** 2007 Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. Pflugers Arch 454:403-413
141. **Wilson P, Morgan J, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ** 2008 Mediators of mineralocorticoid receptor-induced profibrotic inflammatory responses in the heart. Clin Sci (Lond)
142. **Goodfriend TL, Ball DL, Egan BM, Campbell WB, Nithipatikom K** 2004 Epoxy-keto derivative of linoleic acid stimulates aldosterone secretion
1. Hypertension 43:358-363
143. **Mihailidou AS** 2006 Nongenomic actions of aldosterone: physiological or pathophysiological role?
1. Steroids 71:277-280

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	S. 1
Abb. 2: Strukturformel von Aldosteron.....	S. 2
Abb. 3: Schematischer Aufbau der Grundstruktur aller Steroidrezeptoren.....	S. 5
Abb. 4: Darstellung der Affinität verschiedener Liganden zum hMR.....	S. 7
Abb. 5: Wirkung unterschiedlicher Steroidgruppen am hMR.....	S. 7
Abb. 6: Beteiligte Signalwege der Mineralokortikoid-induzierten Gefäßschädigung.....	S. 13/14
Abb. 7: NAD ⁺ -abhängige Umwandlung von Kortisol in Kortison.....	S. 21
Abb. 8: Wirkweise des SEAP-GRE-Reporterassays.....	S. 25
Abb. 9: Wirkung von Aldo, Dexamethason und Hydrocortison in pcDNA-transfizierten Zellen...	S. 32
Abb. 10: Wirkung von Aldo, Dexamethason und Hydrocortison in EGFP-hMR-transfizierten Zellen.....	S. 33
Abb. 11: Wirkung von BAPTA-AM auf pcDNA- und EGFP-hMR-transfizierte Zellen ohne Zugabe von Hormonen.....	S. 35
Abb. 12: Wirkung von BAPTA-AM auf EGFP-hMR-transfizierte Zellen in Gegenwart von Aldosteron.....	S. 35
Abb. 13: ELISA: Einfluss von BAPTA-AM auf die EGFP-hMR-Menge.....	S. 36
Abb. 14: Intrazelluläre Calcium-Konzentration nach Gabe von Ionomycin.....	S. 36
Abb. 15: Wirkung von Ionomycin auf EGFP-hMR transfizierte Zellen in Gegenwart von Aldosteron.....	S. 38

Abb. 16: ELISA: Einfluss von Ionomycin auf die EGFP-hMR-Menge.....	S. 38
Abb. 17: Einfluss von BIM auf pcDNA- und EGFP-hMR-transfizierte Zellen in Abwesenheit und Gegenwart von Aldosteron.....	S. 39
Abb. 18: ELISA: Einfluss von BIM auf die EGFP-hMR-Menge.....	S. 40
Abb. 19: Einfluss von PMA und DOG auf pcDNA- und EGFP-hMR- transfizierte Zellen (in An- und Abwesenheit von Aldosteron).....	S. 41
Abb. 20: ELISA: Einfluss von PMA und DOG auf die EGFP-hMR-Menge....	S. 41
Abb. 21: Wirkung von Wortmannin und LY 294002 auf pcDNA- und EGFP- hMR-transfizierte Zellen (in An- und Abwesenheit von Aldosteron).....	S. 43
Abb. 22: ELISA: Einfluss von Wortmannin auf die EGFP-hMR-Menge.....	S. 43
Abb. 23: Einfluss von H ₂ O ₂ auf die SEAP-GRE-Aktivität in pcDNA- und EGFP-hMR-transfizierten Zellen (ohne Aldosteron).....	S. 45
Abb. 24: Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Aldosteron-induzierte MR-Aktivierung...	S. 45
Abb. 25: Änderung der Gesamt-Proteinmenge und der EGFP-Menge bei zunehmender H ₂ O ₂ -Konzentration.....	S. 46
Abb. 26: Einfluss von H ₂ O ₂ auf AP1-SEAP- und NFκB-SEAP-Konstrukte...	S. 47
Abb. 27: ELISA: Einfluss von 0,5 mM H ₂ O ₂ auf die EGFP-hMR-Menge.....	S. 47
Abb. 28: relative Aldosteron-Wirkung bei zunehmender H ₂ O ₂ -Konzentration...	S. 48
Abb. 29: relative Dexamethason-Wirkung bei zunehmender H ₂ O ₂ - Konzentration.....	S. 49
Abb. 30: relative Hydrocortison-Wirkung bei zunehmender H ₂ O ₂ - Konzentration.....	S. 49

Abb. 31: Verteilung des EGFP-hMR in den Zellkompartimenten (nur Vehikel)	S. 50
Abb. 32: Verteilung des EGFP-hMR in den Zellkompartimenten nach Gabe von 1 nM Aldo.....	S. 51
Abb. 33: Verteilung des EGFP-hMR in den Zellkompartimenten nach Gabe von 0,5 mM H ₂ O ₂	S. 51
Abb. 34: Verteilung des EGFP-hMR in den Zellkompartimenten nach Gabe von 1 nM Aldo + 0,5 mM H ₂ O ₂	S. 52
Abb. 35: Einfluss von 1 nM Aldosteron auf die (v.a. extrazelluläre) Radikalmenge (mit und ohne hMR).....	S. 53
Abb. 36: NAD ⁺ - abhängige Umwandlung von Kortisol in Kortison.....	S. 58
Tab. 1: Aktivierungspotenzial von GR/MR in HEK-Zellen durch Aldo, Dexa und Hydro in unterschiedlichen Konzentrationen.....	S. 33

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Gekle, der mir die Möglichkeit gab, die vorliegende Dissertation am Institut für Physiologie der Universität Würzburg anzufertigen.

Bei allen Fragen und Problemen erwies sich Herr Prof. Gekle als offener, geduldiger und anregender Ansprechpartner, dessen engagierte Betreuung mir stets als Vorbild in Erinnerung bleiben wird.

Herrn Prof. Silbernagl sowie seiner Nachfolgerin Frau Prof. Kuhn möchte ich für die freundliche Aufnahme in den Lehrstuhl danken und für die Möglichkeit, die dortigen Laboreinrichtungen nutzen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Dr. Großmann für die Einarbeitung in das Thema, ihre Hilfe bei Methodik und Auswertung und für ihre gute Laune am Nachbarschreibtisch.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die zahlreichen anregenden Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima sowie die Bereitschaft, mir bei allen größeren und kleineren Problemen im Laboralltag zur Seite zu stehen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch speziell bei Frau Freudinger und Frau Mildemberger für die Einführung in die Labortechniken bedanken.

Dank gilt auch meiner Familie und Freunden für die Geduld und die stete Motivation.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Name, Vorname: Pfau, Anja

Geburtsdatum: 17.05.1982

Geburtsort: Haßfurt

Bekenntnis: römisch-katholisch

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1988-1992: Grundschule Ziegelbrunn, Haßfurt

1992-2001: Regiomontanus-Gymnasium Haßfurt

2001: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

2001: Qualifikation für ein Studium für besonders Begabte (gemäß Art. 10 Abs. 1 des Bayr. Begabtenförderungsgesetzes)

Hochschulbildung:

10/2001 – 06/2008: Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

08/2003: Ärztliche Vorprüfung

06/2008: 2. Ärztliche Prüfung und Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr:

02-06/2007: Allgemein-/Unfallchirurgie am Klinikum Aschaffenburg

06-10/2007: Anästhesiologie am Klinikum Aschaffenburg

10-12/2007: Innere Medizin am Strong Memorial Hospital in Rochester, N.Y., USA

12/2007-01/2008: Innere Medizin an der Universitätsklinik Würzburg (Med. Klinik II)

Seit August 2008 als Assistenzärztin der Inneren Medizin im Klinikum am Bruderwald in Bamberg tätig.

Veröffentlichung:

Pfau A, Grossmann C, Freudinger R, Mildenerger S, Benesic A, Gekle M 2007:
“Ca²⁺ but not H₂O₂ modulates GRE-element activation by the human mineralocorticoid receptor in HEK cells”. Mol Cell Endocrinol 264:35-43