

Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Physiologie I
Vorstand: Prof. Dr. med. M. Kuhn

Die Kommunikation zwischen Aldosteron, dem humanen Mineralokortikoidrezeptor und der cAMP/CRE - Signalkaskade

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

vorgelegt von

Martin Wuttke

aus Würzburg.

Würzburg, Februar 2009

Referent: Prof. Dr. M. Gekle
Koreferent: Prof. Dr. C. Wanner
Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2010

Der Promovent ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite	1
Erste Hinweise auf pathologische Eigenschaften des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems		2
Die Suche nach der fibrogenen Komponente des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems		2
Medikamentöse Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems		3
Klinische Studien der Mineralokortikoidrezeptor-Blockade: RALES und EPHESUS		3
Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem bei chronischer Herzinsuffizienz		6
Katecholamine bei chronischer Herzinsuffizienz		7
Bisherige Arbeiten mit Bezug auf die cAMP / Mineralokortikoidrezeptor-Interaktion		9
Fragestellung und Handlungsstrategie		11
Methoden		12
Ablauf		12
Zellkultur (Subkultivieren, Ansaat)		13
Transfektion		13
Inkubation		14
Zellyse		14
SEAP Reporter Assay		15
Bicinchoninic Acid –Proteinbestimmung		16
Enhanced Green Fluoreszent Protein – Bestimmung		16
Gewinnung von pDNA		17
Auswertung		17
cAMP- und Kollagenelisa		17
Western Blot		17
Materialien		19

Ergebnisse

Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor stimulieren CRE-SEAP minimal	21 22
Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor inhibieren die Adrenalin-induzierte beta-adrenerge cAMP/CRE – Aktivierung	24
Aldosteron hemmt den cAMP-Signalweg auch bei blockiertem cAMP-Abbau	27
Die A- und B-Domänen des hMRs sind für die cAMP/CRE-Inhibition wichtig	28
Aldosteron inhibiert den cAMP/CRE – Signalwegs an oder stromabwärts der ACL	29
Aldosteron vermindert die cAMP-Produktion der aktivierten Adenylatzyklase geringfügig	31
Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor inhibieren die CRE-Aktivierung durch db-cAMP	34
Ca ²⁺ besitzt eine Bedeutung für die Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron	35
Gi-Proteine sind nicht an der Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron beteiligt	37
Aldosteron inhibiert Forskolin-stimuliertes cAMP/CRE-Signaling auch in hAoSMCs	38
Aldosteron vermindert die Forskolin- und Adrenalin-induzierte Inhibition der Kollagen I – Sekretion in hAoSMCs	40

<u>Diskussion</u>	41
-------------------	----

<u>Zusammenfassung</u>	47
------------------------	----

<u>Literaturverzeichnis</u>	48
-----------------------------	----

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	50
------------------------------	----

<u>Danksagung</u>	
-------------------	--

<u>Lebenslauf</u>	
-------------------	--

Einleitung

Erste Hinweise auf pathogene Eigenschaften des RAAS
Die Suche nach der fibrogenen Komponente des RAAS
Medikamentöse Inhibition des RAAS
Klinische Studien der hMR – Blockade: RALES und EPHEBUS
Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem bei CHF
Katecholamine bei CHF
Bisherige Arbeiten mit Bezug auf die cAMP / hMR Interaktion
Fragestellung und Handlungsstrategie

Übersicht

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist im menschlichen Organismus physiologisch an der Regulation des Blutdrucks inklusive des Salz- und Wasserhaushalts beteiligt. Wird dieser Hormonregelkreis jedoch exzessiv aktiviert, z. B. im Rahmen einer Herzinsuffizienz, kommt es unter Anderem zu pathologischer Kollagenvermehrung im Gefäßsystem und im Herzen. Kardiovaskuläre Funktionsstörungen, wie z. B. Arteriosklerose und Herzinfarkt, sind die Folge.

Aldosteron und sein Rezeptor wurden im Tierversuch als für die Fibrose wesentliche Komponenten des Renin – Angiotensin – Aldosteron – Systems identifiziert [1][2][3][4][5][6].

Die klinische Relevanz der Aldosteron-induzierten kardiovaskulären Fibrose wird durch die Studien RALES und EPHEBUS eindrucksvoll belegt. Sie zeigen, dass medikamentöse Hemmstoffe des hMR antifibrotisch wirken und die Mortalität der Herzinsuffizienz und des akuten Myokardinfarkts reduzieren [7][8].

Bei chronischer Herzinsuffizienz (CHF) befindet sich nicht nur das RAAS, sondern auch das sympathische Nervensystem (SNS) in einem erhöhten Funktionszustand. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Adrenalin- und wahrscheinlich auch Noradrenalin-Serumkonzentrationen Kardiomyozyten und Fibroblasten durch einen nicht vollständig geklärten Mechanismus schädigen kann [9][10].

Wenn sowohl das RAAS als auch das SNS parallel aktiv sind, besteht die Möglichkeit, dass diese beiden Systeme miteinander kommunizieren. Eine solche Kommunikation könnte eine Bedeutung für Krankheitsverlauf und Mortalität bei der Herzinsuffizienz besitzen. Bisher gibt es zu dieser Fragestellung nur wenige, uneinheitliche Daten.

Erste Hinweise auf pathologische Eigenschaften des RAAS

Dass ein Zusammenhang zwischen Aktivierung des RAAS und Herz- und Gefäßkrankheiten besteht, wurde bereits 1964 von J. Conn erkannt [11]. Dem sog. Conn – Syndrom bzw. primären Hyperaldosteronismus liegt eine deregulierte Produktion von Aldosteron zu Grunde, meist als Folge eines Adenoms oder seltener nodulärer Hyperplasie der Nebennierenrinde. Die Aldosteron-mediierte, vermehrte Rückresorption von Natrium und Wasser verursacht arterielle Hypertonie, die erhöhte Ausscheidung von Kalium führt zu Hypokaliämie und Herzrhythmusstörungen. Es entwickeln sich kardiovaskuläre Fibrosen; im Endstadium entsteht eine schwere Linksherzhypertrophie.

Die Suche nach der fibrogenen Komponente des RAAS

Um die Fibrose-induzierende Komponente des RAAS zu identifizieren, wurden spontan hypertensive, für Schlaganfälle prädisponierte Ratten (SHRSP) eingesetzt. Sie entwickeln bei kochsalzreicher Ernährung nach wenigen Wochen schwere Hypertension, zerebrovaskuläre Schäden und maligne Nephrosklerose mit Proteinurie.

Mit Enalapril und Captopril, Hemmstoffen des für die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II verantwortlichen Enzyms ACE, lässt sich die Entwicklung der SHRSP – typischen Läsionen verhindern. Damit führen hohe Blutkonzentrationen von Angiotensin I allein nicht zur Fibrose [1][2].

Angiotensin II entfaltet einen Teil seiner Effekte, z. B. die Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, über einen membranständigen Rezeptor, den AT₁ – Rezeptor. Losartan, ein kompetitiver Hemmstoff des AT₁ – Rezeptors, vermindert die SHRSP – typischen Läsionen signifikant. Ob AT II und/oder Aldosteron Auslöser der Fibrose sind, bleibt unklar [3].

Aldosteron wird durch Spironolacton an seinem Rezeptor kompetitiv inhibiert. Durch die Implantation von Spironolacton-sezernierenden Pellets ließen sich die SHRSP – typischen Läsionen deutlich reduzieren. Damit kann Aldosteron eigenständig die beschriebenen Läsionen verursachen und scheint ein wichtiger Mediator für Gefäßschäden zu sein [4].

Bei gewöhnlichen, uninephrektomierten Ratten können durch Aldosteron-Infusion und kochsalzreiche Diät Proteinurie sowie vaskuläre, glomeruläre und tubulointerstitielle Schäden ausgelöst werden. Weder Enalapril noch Losartan konnten diese Schäden unterbinden. In diesem Setting war entweder ATII supprimiert oder der AT₁ - Rezeptor geblockt; Aldosteron allein war also für die Entstehung von Gefäßläsionen hinreichend [5].

Diese Studien zeigen, dass Aldosteron bei Kochsalzbelastung im Organismus Gefäßschäden auslösen kann. Außerdem führt Aldosteron im Herzen zu interstitieller Fibrose und Zunahme der Myozytenzahl [12][13].

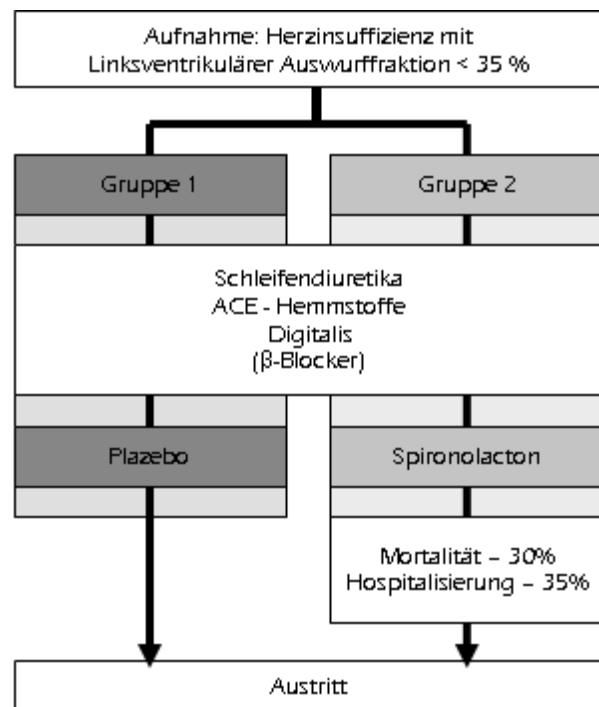
Medikamentöse Inhibition des RAAS

Durch ACE – Inhibitoren und AT1 – Blockern kann die Wirkung von AT II dauerhaft supprimiert bzw. inhibiert werden. Der Aldosteronspiegel jedoch kann mit diesen Medikamenten nicht dauerhaft gesenkt werden („Aldosteron escape“ [14]); daher sind sie nicht als Monotherapie für die Behandlung Aldosteron-induzierter Schäden geeignet. Deshalb sollte in diesen Fällen der hMR durch einen seiner Antagonisten, Spironolacton und Eplerenon, blockiert werden.

Klinische Studien der hMR - Blockade: RALES und EPHEBUS

Nach dem Nachweis im Tiermodell, dass hMR – Antagonisten die Entstehung Aldosteron – induzierter kardiovaskulärer Läsionen verhindern können, wurden Studien zum Nachweis der Wirksamkeit und Verträglichkeit beim Menschen konzipiert.

Mit der **Random Aldactone Evaluation Study (RALES)** [7] wurde überprüft, ob hMR – Hemmstoffe den Therapieerfolg bei CHF verbessern. Um eine homogene Versuchsgruppe zusammen zu stellen, wurden in die Studie nur CHF - Patienten mit linksventrikulärer Auswurfraction unter 35% aufgenommen. Aus diesen Patienten wurden eine Versuchs- und eine Experimentalgruppe gebildet. Beide Gruppen wurden standardgemäß mit Schleifendiuretika, ACE – Hemmern und teilweise mit Digitalis oder β –Blockern behandelt; die Experimentalgruppe erhielt zusätzlich 25 mg Spironolacton.



Nach zwei Jahren wurde die Studie nach einer Zwischenauswertung abgebrochen, die zeigte, dass die Sterblichkeit in der Experimentalgruppe gegenüber der Kontrollgruppe um 30% niedriger lag; die Zahl an Krankenhauseinweisungen sank um 35%.

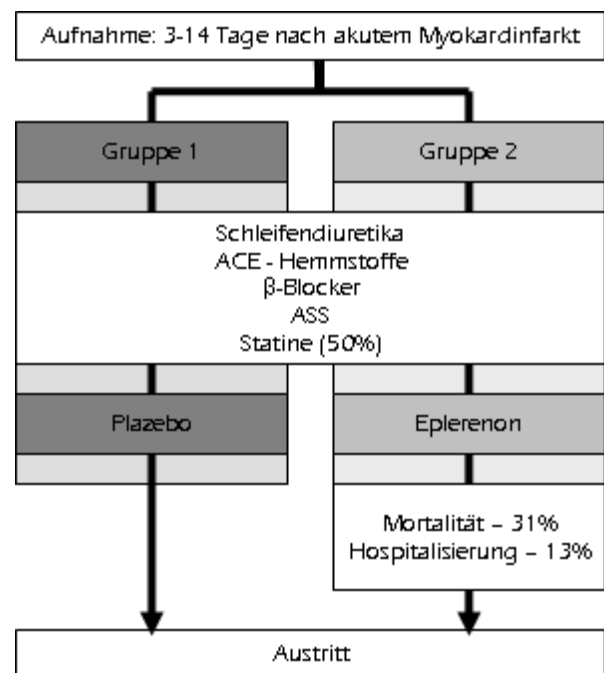
Diese erstaunliche Verbesserung des Therapieerfolgs bei CHF durch hMR - Antagonisten wird aktuell dadurch erklärt, dass diese Medikamente die Fähigkeit von Aldosteron unterbinden, die kardiale Kollagensynthese zu stimulieren; ein Überschuss an Kollagen in der extrazellulären Matrix des Herzens führt zu Ventrikelsteifigkeit und diastolischer Füllungsstörung.

Die Ventrikelfibrose wird außerdem für die Entstehung von Rhythmusstörungen verantwortlich gemacht. Diese Störungen werden durch die Inhibition des hMR reduziert [7].

In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, dass der dauerhafte Einsatz von hMR – Antagonisten ein schwerwiegendes Problem mit sich bringt: durch die hMR - Blockade kommt es zu verminderter Kaliumelimination und als Folge dessen zu Hyperkaliämie, die das Aussetzen der Medikation erzwingen kann. Eine Lösung dieses Problems steht noch aus [15].

In der **Eplerenon – Post – Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS)** [8] wurde die Wirksamkeit von hMR – Hemmstoffen bei CHF – Patienten nach akutem Myokardinfarkt (AMI) überprüft.

Die Pathophysiologie nach einem AMI unterscheidet sich von den Krankheitsvorgängen bei einer chronischen CHF in einer Vielzahl von Faktoren, wie z. B. der akuten Freisetzung von Katecholaminen, dem Ausmaß der Aktivierung des RAAS, dem Grad des ventrikulären Remodellings und diversen anderen Faktoren. Deshalb war es



sinnvoll, für diese Patienten eine weitere Studie mit hMR - Antagonisten durchzuführen. Die teilnehmenden Patienten mit LVAF < 40% wurden 3 bis 14 Tage nach Auftreten eines AMI in die randomisierte Doppelblindstudie aufgenommen. Alle Patienten in der Studie wurden medikamentös mit ACE – Hemmstoffen, Aspirin, Betablockern, Diuretika behandelt, ungefähr die Hälfte bekamen zusätzlich Statine. In der Experimentalgruppe wurde als hMR – Antagonist Eplerenon verabreicht, das zwar niederaffiner, aber mehr als hundert Mal spezifischer für den hMR als Spironolacton ist. Aus diesem Grund führt es seltener zu unerwünschten Nebeneffekten über Progesteron- und Androgenrezeptoren,

wie z. B. Gynäkomastie, Brustschmerz und Impotenz beim Mann, Libidoverlust und Menstruations-unregelmäßigkeiten bei der Frau.

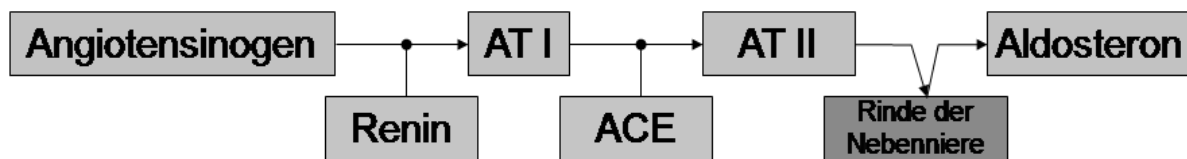
25 mg Eplerenon pro Tag reduzierten die kardiovaskuläre Mortalität um 31% und die Hospitalisierungsrate aus kardiovaskulären Gründen 13%. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Subgruppen [8].

Abbruchskriterium	Placebo	Eplerenon	Risikoreduktion (%)
Tod (alle Ursachen)	153	107	30
Hospitalisierung (kardiovaskulär)	329	287	13
Tod (kardiovaskulär)	147	101	31
Plötzlicher Herztod	47	30	36
Hospitalisierung (fatal oder nichtfatal)	138	114	17

Auch hier besteht ein Erklärungsansatz für die Verbesserung des Therapieerfolgs; durch Hemmung der Kollagensynthese vermindert der hMR – Antagonist Eplerenon die nach einem AMI auftretende reaktive Fibrose im Herzen und ermöglicht dadurch eine physiologische Narbenbildung [16].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem bei CHF.

Herzinsuffizienz ist durch eine verminderte, zur Organversorgung inadäquate Auswurfleistung des Herzens definiert. CHF hat eine Reihe von Ursachen, wie z. B. langjährigen arteriellen Hypertonus, Verlust von funktionalem Myokard nach einem Infarkt oder Klappenfehler. Aufgrund der Herzschädigung sinken die Auswurfleistung des Herzens und der arterielle Blutdruck. In den afferenten Arteriolen der Glomeruli führen der erniedrigte Blutdruck und ein über Barorezeptoren reflektorisch erhöhter Sympathikotonus zu vermehrter Sekretion von Renin durch den juxtaglomerulären Apparat. Renin ist eine Endoprotease, die aus dem im Blut zirkulierenden Angiotensinogen das Oligopeptid Angiotensin I (ATI) abspaltet; durch die am Endothel befindliche Protease Angiotensin I – Converting - Enzyme wird daraus ATII gebildet. ATII stimuliert die Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde, das die Natrium- und Wasserrückresorption an der Niere und im Colon steigert. Verschiedene Komponenten des Systems, vor allem aber ATII, bewirken eine Vasokonstriktion. Der periphere Widerstand steigt, und damit auch der arterielle Blutdruck.



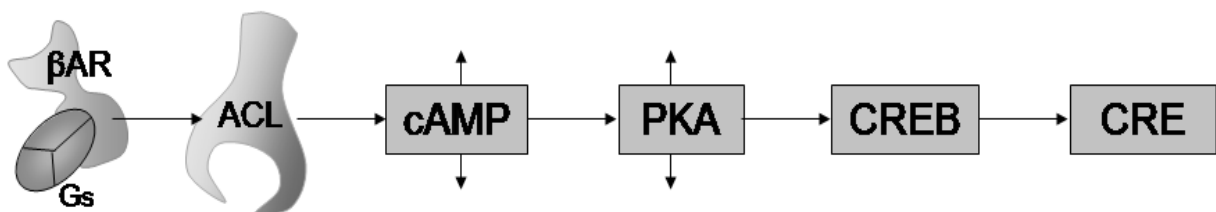
Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Durch das RAAS wird beim Gesunden bei Salz- und Wassermangel ein ausreichender Blutdrucks und der Organdurchblutung gewährleistet; mit Beseitigung des Mangelzustandes steigt der Blutdruck, weniger Renin wird sezerniert und das RAAS kehrt in seinen Ausgangszustand zurück. Da aber die Auswurfleistung des Herzens beim Patienten mit CHF nicht wie beim Gesunden wieder steigt und den Blutdruck erhöht, verbleibt das RAAS in einem permanenten Aktivzustand, um den zur Organperfusion benötigten arteriellen Blutdruck aufrecht zu erhalten. Das Gleiche gilt für das sympathische Nervensystem. Die chronische Aktivierung dieser beiden Systeme führt zu erhöhter Nachlast und somit gesteigerter Herzarbeit; außerdem bestehen kontinuierlich erhöhte Aldosteron- und Adrenalin Spiegel, die das Herz schädigen können.

Katecholamine bei CHF.

Katecholamine entfalten ihre Wirkung am Herzen über adrenerge β_1 - und β_2 -Rezeptoren, die hauptsächlich an G_s , die β_2 -Rezeptoren aber auch an G_T -Proteine gekoppelt sind. Bindet ein Agonist an einen β_1 -Rezeptor, wird in den α_s – Untereinheiten der an den Rezeptor gebundenen G – Proteine GDP durch GTP ersetzt; dadurch wird die α_s – Untereinheit aktiviert und von den $\beta\gamma$ – Untereinheiten und dem Rezeptor getrennt. Die α_s – Untereinheiten der G_s – Proteine stimulieren die Adenylatzyklase zur cAMP – Produktion; die Erhöhung des cAMP - Spiegels in der Zelle bewirkt u. a. die Aktivierung der Proteinkinase A. Dieses Enzym phosphoryliert diverse Ziele in der Zelle, wie z. B.

- das *cAMP responsive element binding protein*, das über CRE genotrope Katecholamineffekte vermittelt [17],
- *L-Typ-Kalziumkanäle*, die nach Phosphorylierung für Calcium permeabler werden, so dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt und die Kontraktionskraft des Kardiomyozyten zunimmt [18],
- verschiedene *Proteine des kontraktilen Apparats* (z. B. Troponin I), die so für Calcium sensibilisiert werden und die Kontraktionskraft des Kardiomyozyten weiter verstärken [19],
- *Phospholamban*, das im phosphoryliertem Zustand die SERCA nicht länger inhibiert, so dass vermehrt Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen wird und der Kardiomyozyt schneller für eine erneute Kontraktion bereit ist [20], sowie
- den β_1 – *Adrenozeptor*, dessen Phosphorylierung zu seiner Desensibilisierung und Internalisierung führen kann [21]. Dies führt zur Desensibilisierung des Kardiomyozyten gegenüber adrenerger Stimulation.
- Beim gesunden Menschen bewirken Katecholamine positive Ino-, Chrono- und Dromotropie des Herzens, d. h. eine Anpassung der Herzleistung an gesteigerte Anforderungen z. B. bei körperlicher Aktivität und in Stresssituationen.



Der Betarezeptor - Adenylatzyklase – cAMP – Signalweg

β_2 - Rezeptoren und G_i – Signaling bewirken andere Signalfunktionen, z. B. die Inhibition der ACL; sie vermitteln möglicherweise eine Schutzfunktion im kranken Kardiomyozyten.

Bei CHF sinkt das Herzzeitvolumen; der Blutdruck nimmt ab, die Stimulation von Barorezeptoren sinkt, ihre zentral hemmende Wirkung auf den Sympathikus wird reduziert und das SNS reflektorisch aktiviert. Da das geschädigte Herz seine Auswurfleistung nur ungenügend steigern kann, kehrt das System nicht in seinen Ausgangszustand zurück; das SNS bleibt aktiviert. Die SNS – Daueraktivierung bewirkt im Kardiomyozyten eine Reihe von pathologischen Veränderungen: es kommt zur Desensibilisierung [22][23] der β_1 – Rezeptoren und einer Verminderung ihrer Zahl [24][25]; β_2 – Rezeptoren werden vermehrt an G_i – Proteinen gekoppelt [26][27].

Es ist bis jetzt nicht endgültig geklärt, ob dieser Zustand eine Adaptationsleistung der Kardiomyozyten ist, die sie vor Schäden durch das SNS schützt - z. B. vor Arrhythmien, Hypertrophie oder gestörtem Energiehaushalt -, oder ob durch diese Konstellation das Herz weiter geschädigt wird, da es auf den bei der CHF gesteigerten Bedarf an Kontraktions- und Auswurfleistung nicht adäquat reagieren kann. Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Adaptationsleistung der Kardiomyozyten ein Schutzmechanismus ist [10].

Wie β -Blocker, die in der Therapie der CHF zum Einsatz kommen, diesen Zustand verbessern, ist unklar. Denkbar sind zwei Modelle: entweder wird durch die Blockade der β – Rezeptoren das Herz vor einem schädlichen sympathischen Einfluss geschützt [28][29][30][31][32][33], oder die Blockade ermöglicht eine Resensibilisierung des intrazellulären Signalwegs [34][35][36].

Bisherige Arbeiten mit Bezug auf eine cAMP / hMR - Interaktion.

Bisher gibt es nur wenige, uneinheitliche Daten zur Interaktion zwischen cAMP- und hMR-Signaling. Unklar ist, ob die Interaktion der Signalwege Aldosteron- und/oder hMR-abhängig sind, ob synergistische oder antagonistische Wechselwirkungen bestehen, die Dauer eines Effekteintritts und zu Grunde liegende Mechanismen. Es bleibt weiterhin unklar, wenn auch unwahrscheinlich, ob Aldosteron schnelle, nicht-genotrope Effekte besitzt.

Diese Arbeit hat zum Ziel, die prinzipielle Möglichkeit und denkbare Mechanismen einer cAMP / hMR – Interaktion zu untersuchen.

Bisherige Befunde in der Übersicht:

- **Kotransfektion mit dem hMR inhibiert die PUC-1-Stimulation durch 8-bromo-cAMP.** Die Autoren schlossen aus DNA-Anlagerungsstudien, dass sowohl ATF/CREB, als auch der hMR an PUC-1, das ein CRE enthält, binden. Der hMR kann also möglicherweise durch direkte Bindung an PUC-1 die Stimulation durch ATF/CREB inhibieren [37].
- **Aldosteron erhöht nach einer Minute hMR-unabhängig die cAMP- und Ca²⁺-Konzentration in Mausepidermiszellen.** Die Effekte in Knockoutmäusen sind ausgeprägter als in den Wildtyp – Mäusen [38]. Die Ergebnisse dieser Studie konnten jedoch bislang nicht reproduziert werden.
In einer weiteren Studie wurde eine Aldosteron-induzierter, Ca²⁺ - abhängiger 1,5- bis 2,5-facher Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in VSMC gemessen. Dieser Effekt trat innerhalb einer Minute ein und wurde durch hMR-Antagonisten, Transkriptions- und Proteinsynthese-Inhibitoren nicht unterbunden. Außerdem wurde eine zeit-abhängige CREB-Phosphorylierung gemessen [39]. Auch die Ergebnisse dieser Studie wurden bislang nicht bestätigt.
- **Aldosteron verändert in As4.1 Zellen die cAMP-Konzentration nicht.** Die Reninexpression in As4.1 – Zellen (renale juxtaglomeruläre Zellen) wird durch den β -Rezeptor/ACL/cAMP-Signalweg stimuliert. As4.1-Zellen exprimieren den hMR; eine Interaktion zwischen dem ACL/cAMP- und dem hMR-Signalweg ist also möglich.
Mit Forskolin/IBMX wurde die Reninexpression stimuliert. Aldosteron erhöhte die Renin-mRNA-Konzentration per se sowie zusätzlich zu For/IBMX. Die cAMP-Konzentration wurde durch Aldosteron nicht beeinflusst. Die Erhöhung der Renin-

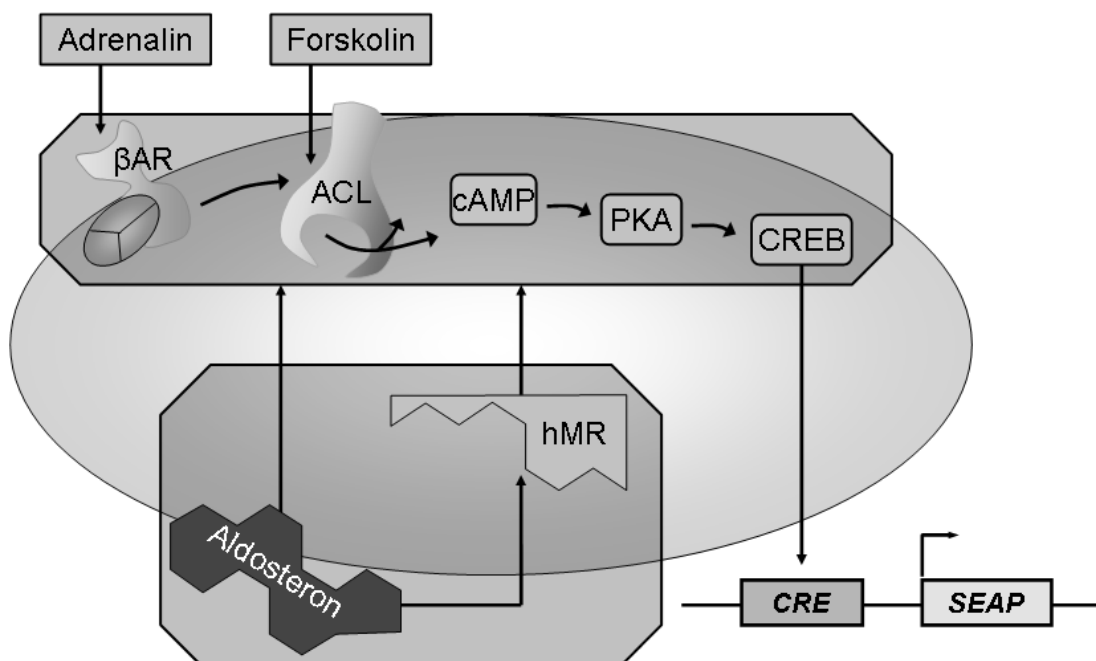
mRNA-Konzentration wurde durch eine Stabilitätserhöhung durch Aldosteron erklärt. [40].

- **In stabil hMR – transfizierten Zellen (M – Zellen) war die cAMP – Bildung gegenüber untransfizierten Zellen (RC.SV3) nach Isoproterenolgabe 6-fach erhöht.** Weder Aldosteron noch Spironolacton hatte einen Effekt. Die Expression von $G\alpha$ war erhöht, die von GRK3 reduziert; die ACL war nicht verändert. Zur Förderung des Katecholamin - Signalwegs war die n-terminale Domäne und die DNA - Bindedomäne des hMR unerlässlich [41]. Es bleibt unklar, über welchen Mechanismus der hMR die cAMP-Bildung stimuliert.
- **8-bromo-cAMP und Aldosteron wirken hMR-abhängig synergistisch auf GRE.** In HepG2-Zellen stimulierte 8-bromo-cAMP hMR-abhängig Promotoren mit GR-Elementen. Bei zusätzlicher Aldosterongabe wurde ein Synergismus mit cAMP auf GRE festgestellt, der bei höherer Anzahl von GR – Elementen abnahm. Protein kinase inhibiting peptide (PKI), ein Inhibitor der PKA unterbrach die Induktion durch cAMP und Aldosteron; ein funktioneller cAMP – Weg scheint also für die Stimulation der Transkription unerlässlich. Vermutlich fördert PKA die Bindung des hMR an GRE, gegebenenfalls durch Phosphorylierung eines Repressors. Der n-Terminus des hMRs war für die Interaktion notwendig [42].
- **Aldosteron erhöht in Gegenwart des hMR dosis-abhängig die cAMP-Konzentration.** Gemessen wurde das cAMP durch Radioimmunoassay in Sammelrohr-Mikroschnitten, die mit Aldosteron und ggf. einem Phosphodiesteraseinhibitor inkubiert wurden. Sammelrohrzellen exprimieren den hMR.
Aldosteron bewirkte innerhalb von vier Minuten eine dosisabhängige cAMP-Erhöhung, die von den Autoren als nicht-genotroper Aldosteroneffekt gedeutet wird [43].
- **Die Signalwege von Aldosteron und cAMP besitzen gemeinsame Zielmoleküle in distalen Tubuluszellen der Maus.** Sowohl Aldosteron, als auch 8-Bromo-cAMP erhöhten die Expression der α_1 Na^+ - K^+ -ATPase [44].

Fragestellung der Arbeit. Da sowohl das RAAS als auch das SNS unerwünschte Effekte am insuffizienten Herzen ausüben, erscheint es möglich, dass diese Systeme interagieren. Fragestellungen dieser Arbeit sind:

1. Können Aldosteron und der hMR mit dem cAMP/CRE – Signalweg in Ruhe interagieren?
2. Können Aldosteron und der hMR mit dem durch FSK oder Adrenalin stimulierten cAMP/CRE – Signalweg interagieren?
3. Auf welcher Ebene und durch welchen Mechanismus besteht die Interaktion?
4. Beeinflusst diese Interaktion die Kollagensekretion in VSMC?

Handlungsstrategie. Um eine Interaktion zwischen RAAS und SNS auf molekularer Ebene unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen, wurde ein SEAP Reporter Assay (CRE, GRE) in HEK293 – Zellen eingesetzt. Nach Bedarf wurden Plasmide mit hMR- oder β -Rezeptor-DNA durch Transfektion in die Zellen eingebracht. Der cAMP – Signalweg wurde mit Adrenalin über β -Rezeptoren oder mit Forskolin an der ACL aktiviert.



Methoden

Ablauf
Zellkultur (Subkultivierung, Ansaat)
Transfektion
Inkubation
Zelllyse
SEAP Reporter Assay
Bicinchoninic Acid (BCA) – Proteinbestimmung
Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) - Bestimmung
Gewinnung von pDNA
Auswertung

Ablauf.

Hier wird der typische Ablauf eines Experiments zusammenfassend beschrieben. Zu Beginn eines Versuchs wurden HEK-Zellen auf 24-well Platten angesät. Nach einem Wachstumsintervall von 24 Stunden wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und bei zufriedenstellendem Wachstum mit versuchsrelevanten Plasmiden transfiziert. Im Anschluss an eine weitere mikroskopische Kontrolle wurde nach 48 Stunden Inkubationsmedium beigefügt. Nach Ablauf der Inkubationszeit, die in der Regel zwischen 6 und 24 Stunden betrug, wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgenommen und die Zellen lysiert. Sowohl Medium, als auch Lysat wurden bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Im Medium wurde die Konzentration der SEAP bestimmt, im Lysat wurde die Konzentration von Protein und EGFP bestimmt.

Zellkultur

Für die Fragestellungen der Doktorarbeit wurden human embryonic kidney – 293 – Zellen verwandt, die in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert wurden.

Auswahl der Zellen: HEK sind in der experimentellen Arbeit vergleichsweise einfach zu handhaben; sie wachsen adhärent, lassen sich gut transfizieren und besitzen Fibroblasten-ähnliche Eigenschaften [45]; dadurch bieten sie sich m. E. zum Vergleich mit kardialen Fibroblasten an. Des Weiteren ist bekannt, dass der hMR von HEK nicht exprimiert wird [46]. Das eröffnet die Möglichkeit, den Rezeptor per Transfektion neu in die Zellen einzubringen und die daraus resultierenden Veränderungen zu beobachten.

Subkultivieren: Halbwöchentlich wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche überführt. Dazu wurden die Zellen mit EDTA und Trypsin abgelöst und mit DMEM/HAM (+) aufsuspendiert; 1/10 der Zelllösung wurde in die neue Kulturflasche gegeben und hinreichend DMEM/HAM (+) beigefügt.

Ansaat: Mit der verbleibenden Zelllösung wurden 24-well Versuchsplatten angesät; zu 150 µl Zelllösung wurde 0,5 ml DMEM/HAM (+) pro well gegeben.

Transfektion

Die Transfektion ist ein Verfahren, um Plamid – DNA in Zellen einzubringen. In dieser Arbeit wurde Qiagen Polyfect als Transfektions - Reagenz eingesetzt. Es bündelt die in die Zellen einzubringende DNA in kompakte Strukturen; der entstehende Polyfect-DNA-Komplex besitzt eine positive Gesamtladung und bindet an negativ geladene Strukturen an der Zelloberfläche. Dadurch wird die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtert. Nach Fusion von Endosom und Lysosom innerhalb der Zelle puffert Polyfect den sauren pH des Lysosoms ab und ermöglicht damit, dass die DNA intakt in den Zellkern gelangt.

Durchführung: Für die Transfektion wurde ein Mastermix aus DMEM/HAM (-), der für den Versuch relevanten pDNA und Qiagen Polyfect hergestellt; die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die dafür verwandten Volumina bzw. Massen.

Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit, während der die Zellen gewaschen und mit 250 µl DMEM/HAM (-) beschickt wurden, wurde der Mastermix mit 100 µl DMEM/HAM (-) pro well gestreckt und 100 µl der Lösung auf jedes well der Versuchsplatte gegeben. Dieses Vorgehen entspricht den Richtlinien von Qiagen.

Reagenz	pro Well auf der Versuchsplatte
Medium	10 µl – x µl pDNA
pDNA	0,05 µg bei pEGFP, pCRE-SEAP, pEGFP-hMR, pβAR-2; 0,01 µg bei pβAR-1
Polyfect	2 µl

Inkubation

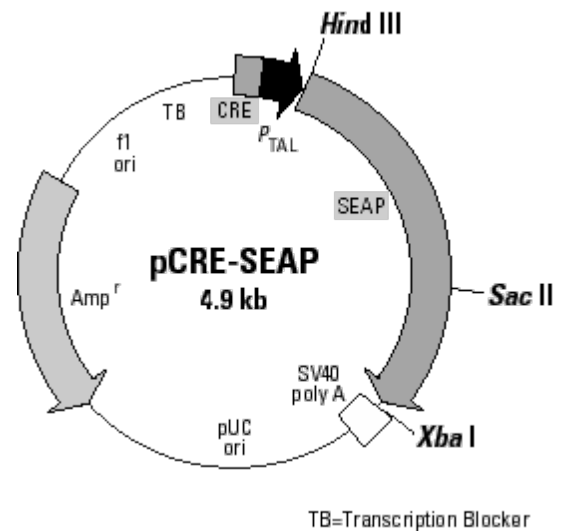
24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgenommen und 300 Mikroliter Inkubationslösung aus DMEM/HAM (-) und Zusätzen (wie z. B. Adrenalin, Aldosteron oder Forskolin) beigefügt. In allen wells wurde die gleiche Konzentration von Lösungsmitteln, wie z. B. DMSO, eingestellt.

Zellyse

Die Versuchszellen wurden nach Abnahme des Inkubationsmediums für 30 Minuten mit 150 µl Triton – X₁₀₀ Lysepuffer (gepuffert mit MOPS, pH 7,4) lysiert und nach Überführung in Eppendorfcaps für 10 Minuten bei 13k RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde zur BCA – Proteinbestimmung und zur EGFP – Bestimmung verwandt, die Pellets verworfen.

SEAP Reporter Assay

Bei dem SEAP – Reporter Assay handelt es sich um ein Verfahren, mit dem die Aktivität von Signalwegen quantitativ gemessen werden kann. Das geschieht mit Hilfe eines Plasmids, welches Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, einen Promoter und ein DNA – Stück mit der Information der sekretorischen alkalischen Phosphatase (SEAP) besitzt. Das hier abgebildete pCRE – SEAP besitzt als Bindestelle drei hintereinander geschaltete cAMP – responsive elements.



Bindet hier ein Transkriptionsfaktor, wird die Expression der SEAP stimuliert und das Enzym wird ins Medium um die Zelle sezerniert. Es katalysiert eine Reaktion, bei der ein fluoreszierendes Produkt entsteht, das photometrisch gemessen werden kann. Aus der Steigung der Fluoreszenz wird die Enzymaktivität errechnet.

Die errechnete Konzentration der SEAP ist proportional zum Integral der Aktivität des Plasmid-spezifischen Signalwegs über die Zeit. Durch die Bildung eines Quotienten aus SEAP – Aktivität und der EGFP – Konzentration im Zytoplasma (s.u.) wird das Signal um die Transfektionseffizienz und unspezifische Effekte auf die Genexpression korrigiert.

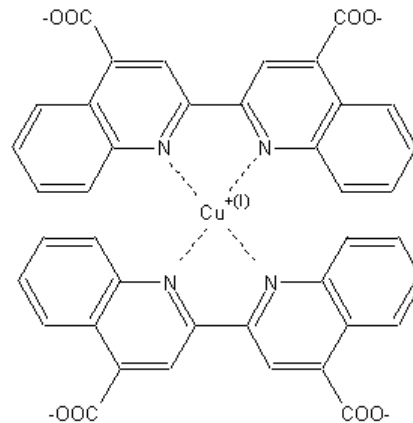
Durchführung: Im Versuch wurden 60 µl Medium mit 60 µl SEAP – Puffer bei 65°C für 30 Minuten inkubiert, um andere Phosphatasen als die SEAP im Medium zu deaktivieren.

Anschließend wurden 100 µl des Inkubats mit 100 µl AttoPhos, einem Substrat der SEAP, versetzt und die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz bei einer Exzitations-/Emissionswellenlänge von 440/575 nm gemessen.

Bicinchoninic Acid – Proteinbestimmung

Bei der BCA – Proteinbestimmung reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Diese ergeben mit der BCA violette Komplexe, deren Extinktion bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann [47]. Mit Hilfe einer Eichkurve wird die Proteinkonzentration bestimmt.

In der Doktorarbeit wurde die Proteinmenge in den Versuchswells bestimmt, um die Zahl vitaler Zellen zum Zeitpunkt ihrer Lyse näherungsweise zu überprüfen.



Bicinchoninic Acid

Durchführung: Im Versuch wurden 15 μ l

Lysat mit 300 μ l BCA – Reagenz bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, bevor die Extinktion gemessen wurde. Als Vergleich wurde eine Eichkurve aus Proteinlösungen mit bekannter Konzentration erstellt.

Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) – Bestimmung

Das grün fluoreszierende Protein ist ein erstmals 1961 von Osamu Shimomura beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. EGFP kann mit anderen Proteinen Gen-spezifisch fusioniert werden [48].

In der Doktorarbeit wurde in jedem Experiment ein Plasmid mit EGFP (pEGFP) als quantitativer Genexpressionsmarker in die Zellen transfiziert.

Durchführung: bei jeder Probe wurde von 100 μ l des Zelllysats die EGFP - Fluoreszenz im Fluoreszenzphotometer bei 395 / 509 nm bestimmt.



Green Fluorescent Protein

Gewinnung von Plasmid - DNA

Um Plasmid - DNA für die Transfektion zu gewinnen, wurden Klone von E. coli - Stämmen, die stabil mit dem gewünschten Plasmid transfiziert wurden, über Nacht in Falconröhrchen bei 37°C und unter Schütteln inkubiert. Als Nährmedium diente LB - Medium, das mit einem passenden Antibiotikum zur Selektion der Plasmid-tragenden Bakterien versetzt wurde. Die Röhrchen wurden bei 5k Umdrehungen für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert.

Die Isolation der pDNA aus den verbleibenden Pellets wurde nach den Standardrichtlinien für HEK des Qiaprep Spin Miniprep Kits durchgeführt.

Plasmid	Antibiotikum
pCRE-SEAP	Ampicillin
phMR	Kanamycin
pEGFP-c1	Kanamycin / Neomycin

Auswertung

Die Zielwerte der Zellkulturversuche waren die Konzentration in den Wells des EGFP, die SEAP-Aktivität und des Gesamtproteins. Das Gesamtprotein diente zur Kontrolle der Vitalität der Versuchszellen.

Die Konzentration der SEAP wurde mit EGFP normiert, um eine unterschiedliche Genexpression der Zellen über die Versuche hinweg zu korrigieren. Das Ergebnis der Normierung wurde als Signalwegaktivität interpretiert.

Kollagen- und cAMP-Elisa

Der Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Elisa) ist eine Methode, um die Konzentration eines Antigens oder eines Antikörpers in einer Probe zu bestimmen. Für die Durchführung der Kollagen- und cAMP-Elisas möchte ich mich herzlich bei Sigrid Mildenberger und Ruth Freudinger bedanken.

Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum semiquantitativen Proteinnachweis in einer Probe. Im ersten Schritt werden die durch SDS denaturierten Proteine anhand ihrer Größe, Ladung und anderer Eigenschaften durch Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Im nächsten Schritt werden die Proteine durch ein zur Laufrichtung der Elektrophorese senkrechtes elektrisches Feld auf Nitrozellulosefolie übertragen.

Anschliessend werden die Proteine auf der Folie mit Protein-spezifischen Antikörpern inkubiert und durch einen zweiten Antikörper, der gegen den F_c-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, markiert. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt, das ermöglicht, die Proteine per Chemolumineszenz auf Film sichtbar zu machen.

In dieser Doktorarbeit wurde für den Nachweis von CREB und pCREB ein Acrylamid-Trenngel mit einer Konzentration von 8%/12% verwendet. Das Sammelgel besaß eine Acrylamid-konzentration von 3%.

Nach Einbringen der zu untersuchenden Proben in eine Elektrophoresekammer wurde in zwei Abschnitten mit einer Dauer von 0,6 und 1,8 Stunden die Elektrophorese durchgeführt. Die Stromstärke betrug im ersten Abschnitt 10,5 mA pro Gel, im zweiten 20mA bei einer Spannung von 220V.

Der anschliessende Blottingvorgang von Gel auf Nitrozellulose dauerte 0,5 Stunden bei einer Spannung von 60V und einer Stromstärke von 205 mA. Die mit den Proteinen beschichtete Nitrozellulosefolie wurde für eine Stunde in Blocking Solution (5% Milchpulver in PBS) gelagert.

Im nächsten Schritt wurde die Folie mit PBS-Tween gewaschen und über Nacht mit dem Antikörper gegen pCREB/CREB inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der rabbit-HRP-Antikörper aufgebracht und für 1 Stunde inkubiert.

Schliesslich wurde die Nitrozellulosefolie mit je 1,5ml ECL-Detektionslösung 1 und 2 benetzt, für eine Minute inkubiert und dann zusammen mit Röntgenfilm für 2 bis 15 Minuten in der Röntgenkassette entwickelt. Danach wurde der Film für 30-40 Sekunden im Entwicklerbad geschwenkt, fixiert und getrocknet.

Acrylamid-Trenngel	
Acrylamid	5,1 ml
APS	0,15 ml
SDS	0,25 ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	3,125 ml
H ₂ O	3,76 ml
TEMED	0,02 ml

Materialien

Material, Firma	Beschreibung
HEK 293 – Zellen	
Wachstumsmedium	DMEM/HAM (+) mit 5% fetalem Kälberserum DMEM/HAM (-) ohne Zusätze LB 10 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7
Plasmide <i>pEGFP-C1 (Clontech)</i>	
<i>pCRE-SEAP (Clontech)</i>	

Material, Firma	Beschreibung
<p><i>pEGFP-hMR – c1</i></p> <p>und dessen Konstrukte: <i>AB</i> <i>DEF</i> <i>CDEF</i></p>	<p>hMR</p> <p>1 AF-1 C D E/F AF-2 984</p> <p>Koaktivatoren Korepressoren</p> <p>DBD</p> <p>LBD</p>
<p><i>ρβ1AR</i> <i>ρβ2AR</i></p>	<p>Die adrenergen Betarezeptoren wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Lohse, Pharmakologisches Institut der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.</p>
SEAP – Puffer	<p>60 mM L-Homoarginin 3 mM MgCl₂ 0.2 mM ZnCl₂ 100 mM Tris-HCl (pH 9.3)</p>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck – Schuchart, Art. 802912
Triton X ₁₀₀ Lysepuffer	<p>0.1 % Triton-X₁₀₀, Serva #37240 20 mM MOPS (s. u.) pH 7.4</p>
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen Kat. Nr. 301107
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen Kat. Nr. 27104
AttoPhos Fluorescent Substrate System	Promega Kat. Nr. S1000
BCA – Reagenz A	Uptima UP 95424A
3 – (N – Morpholino) – Propansulfonsäure	Gerbu #1081 (MOPS)

Ergebnisse

Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor stimulieren CRE-SEAP minimal

Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor inhibieren die Adrenalin-induzierte beta-adrenerge cAMP/CRE – Aktivierung

Aldosteron hemmt den cAMP-Signalweg auch bei blockiertem cAMP-Abbau

Die A- und B-Domänen des hMRs sind für die cAMP/CRE-Inhibition wichtig

Aldosteron inhibiert den cAMP/CRE – Signalwegs an oder stromabwärts der ACL

Aldosteron vermindert die cAMP-Produktion der aktivierten Adenylatzyklase geringfügig

Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor inhibieren die CRE-Aktivierung durch db-cAMP

Ca²⁺ besitzt eine Bedeutung für die Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron

Gi-Proteine sind nicht an der Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron beteiligt

Aldosteron inhibiert Forskolin-stimuliertes cAMP/CRE-Signaling auch in hAoSMCs

Aldosteron vermindert die Forskolin- und Adrenalin-induzierte Inhibition der Kollagen I – Sekretion in hAoSMCs

Aldosteron und der hMR stimulieren CRE-SEAP minimal

Zu Beginn der Arbeit mit dem cAMP/CRE – Signalweg wurde sichergestellt, dass der Signalweg in HEK - Zellen funktional ist. Forskolin, ein Hormon, das die cAMP – Bildung durch die Adenylatcyklase stimuliert, erhöhte die CRE-SEAP – Aktivität signifikant und belegt damit, dass der Signalweg intakt ist (Abb. 1A).

Aldosteron entfaltet eine Vielzahl seiner Effekte über den hMR; deswegen wurde untersucht, ob der hMR in HEK – Zellen exprimiert wird. Da Aldosteron in untransfizierten HEK-Zellen keinen Effekt auf GRE-SEAP hat, wird der hMR nicht in nachweisbaren Mengen exprimiert (Abb. 1B). Anschliessend wurde überprüft, ob sich die HEK – Zellen erfolgreich mit dem hMR transfizieren lassen. In hMR – transfizierten HEK – Zellen erhöhte Aldosteron die GRE-SEAP – Aktivität und belegt damit die gelungene Transfektion des hMRs (Abb. 1B). Außerdem wurde die Expression des hGR untersucht. Dexamethason, ein Agonist des hGR, stimuliert GRE-SEAP (Abb. 1B); das belegt, dass der hGR in HEK exprimiert wird und eine Interaktion mit anderen Signalwegen möglich ist.

Nach Abklärung dieser Grundlagen wurde untersucht, ob Aldosteron den ruhenden cAMP/CRE - Signalweg beeinflusst. Wie aus Abb. 1A ersichtlich ist, veränderte Aldosteron die CRE-SEAP-Aktivität (CSA) in Abwesenheit des hMRs nicht. Nach Transfektion des hMR jedoch führte Aldosteron zu einer geringen, aber signifikanten Stimulation der CSA. Die Aktivierung konnte durch U0126, einen Inhibitor der ERK1/2 – Aktivierung, aufgehoben werden; dies weist auf eine Signaltransduktion über die ERK-Signalkaskade hin [49].

Die CSA – Erhöhung durch Forskolin wurde durch die Transfektion des hMR oder U0126 nicht beeinflusst. Auch Dexamethason veränderte die CSA nicht; der endogene hGR übt also keinen Einfluss auf den ruhenden cAMP/CRE – Signalweg aus.

Folgerungen:

HEK - Zellen

- *besitzen einen funktionalen cAMP/CRE-Signalweg*
- *exprimieren den hMR nicht, lassen sich aber damit transfizieren*
- *exprimieren den hGR*

Der nicht vorstimulierte cAMP/CRE-Signalweg

- *wird durch Aldosteron nach Transfektion des hMR minimal aktiviert (vmtl. über ERK1/2)*
- *wird nicht durch den hGR – Agonisten Dexamethason beeinflusst*

Abb. 1 A

CRE-SEAP-Aktivität in HEK-Zellen, die entweder mit Vektor (EGFP) oder hMR (EGFP-hMR) transfiziert wurden.

Die HEK-Zellen wurden 24 Stunden mit Aldosteron, Dexamethason, Forskolin oder U0126 inkubiert.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 9-18, n.o.p. = 3-6

□ Vektor
 ■ hMR

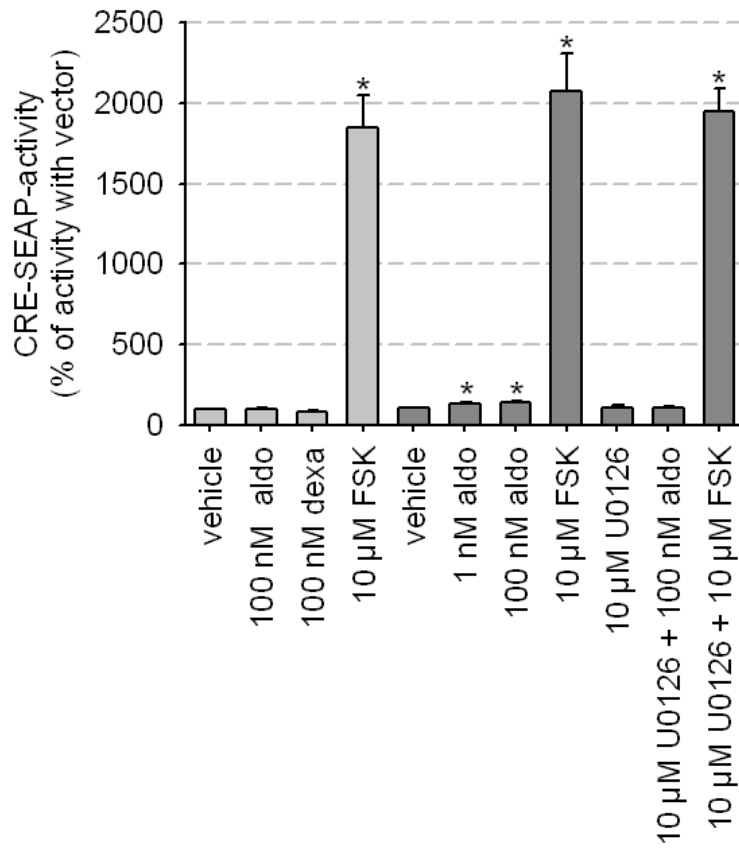


Abb. 1 B

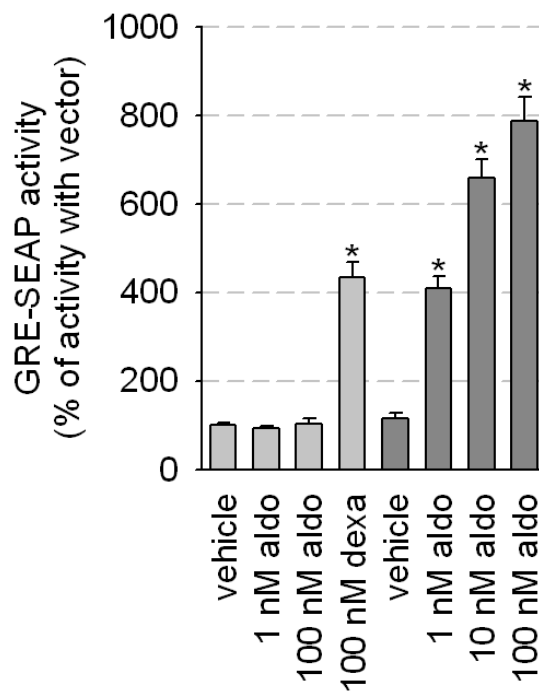
GRE-SEAP-Aktivität in HEK-Zellen, die entweder mit Vektor (EGFP) oder hMR (EGFP-hMR) transfiziert wurden.

Die HEK-Zellen wurden 24 Stunden mit Aldosteron oder Dexamethason inkubiert.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 9, n.o.p. = 3

□ Vektor
 ■ hMR



Aldosteron und der hMR inhibieren die Adrenalin-induzierte beta-adrenerge cAMP/CRE – Aktivierung

Auch wenn Aldosteron und der hMR alleine keinen wesentlichen Effekt auf den nicht-vorstimulierten cAMP/CRE – Signalweg besitzen, ist es möglich, dass bei vorstimulierten cAMP/CRE – Signalweg eine Transaktivierung besteht.

Zur Stimulation des cAMP/CRE – Signalwegs wurde der physiologische Stimulus Adrenalin verwandt. 100 nmol/l Adrenalin bewirkten in Wildtyp-HEK-Zellen keine Erhöhung der CSA (Abb. 2A). Nur hohe Konzentrationen (1 oder 10 $\mu\text{mol/l}$) führten zu einer geringfügigen Erhöhung der CSA. Dies deutet auf das Vorhandensein geringer Mengen endogener Beta – Rezeptoren, ggf. auch Dopaminrezeptoren, in HEK-Zellen hin. Nach Transfektion mit humanen β 1- oder β 2-Rezeptoren (β 1-AR, β 2-AR) reagierten die HEK – Zellen bereits auf 100 nmol/l Adrenalin mit einem ausgeprägten Anstieg der CSA (Abb. 2A). Es ist daher möglich, mit 100 nmol/l Adrenalin den β 1-AR- und β 2-AR-Signalweg ohne Interferenz endogener Rezeptoren der HEK – Zellen zu untersuchen.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigten mit β 1-AR- oder β 2-AR-transfizierte HEK-Zellen in Abwesenheit von Adrenalin eine erhöhte CRE-SEAP – Basalaktivität, die sich als Folge einer Autoaktivierung der Rezeptoren interpretieren lässt und die trotz geringer Plasmidmengen (10 ng pro well) bestand. Aldosteron veränderte die β 1-AR oder β 2-AR-induzierte CSA in HEK-Zellen ohne hMR nicht (Abb. 2B). Nach Transfektion des hMRs bewirkte Aldosteron eine signifikante Inhibition des cAMP/CRE – Signalwegs in β 1- oder β 2-AR – exprimierenden Zellen. Aldosteron verminderte sowohl die β 1/ β 2-AR – Autoaktivierung, als auch die durch Adrenalin induzierte CSA. Dieser Effekt trat bereits nach 6 Stunden ein und schien zu diesem Zeitpunkt für β 2-AR ausgeprägter zu sein.

Folgerungen:

HEK - Zellen

- *exprimieren geringe Mengen endogene Betarezeptoren oder Dopaminrezeptoren, die durch eine Adrenalinkonzentration von 100 nmol/l allerdings noch nicht stimuliert werden*
- *lassen sich mit β 1- und β 2-AR transfizieren, die durch 100 nM Adrenalin stimuliert werden können*

Der mit Adrenalin vorstimulierte β 1- und β 2-AR-Signalweg wird durch Aldosteron nach Transfektion des hMR inhibiert.

Abb. 2 A

CRE-SEAP-Aktivität in HEK-Zellen, die mit β -AR transfiziert wurden.

Wildtypzellen zeigen bei 100 nm/l Adrenalin keine Erhöhung der CSA. Nach Transfektion mit β 1-AR oder β 2-AR induzierte Adrenalin eine starke CRE-SEAP-Aktivierung.

Inkubationsdauer 24 Stunden.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 6-12, n.o.p. = 2-4

- pcDNA
- β 1-AR
- β 2-AR

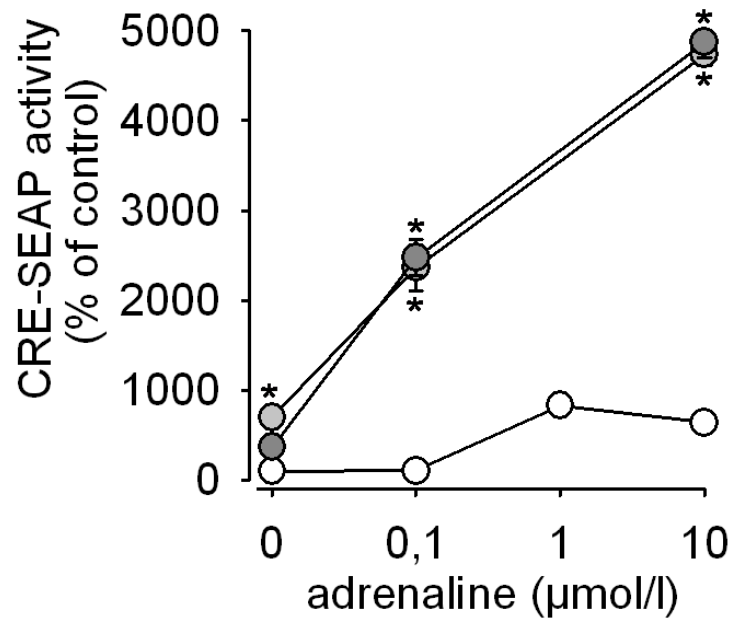


Abb. 2 B

In Abwesenheit des hMR beeinflusst Aldosteron (1 nmol/l) die β 1- und β 2-AR-induzierte CSA nicht.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 6-12, n.o.p. = 2-4

- pcDNA
- β 1-AR
- β 2-AR

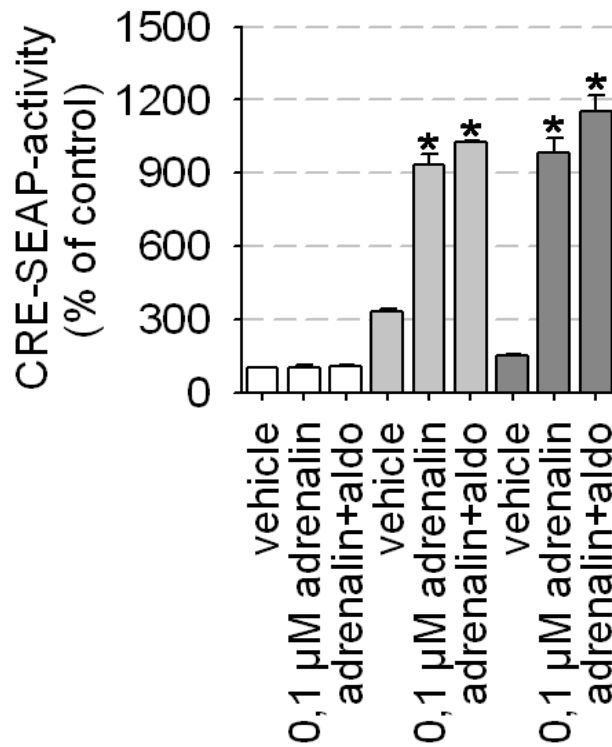


Abb. 2 C

In Gegenwart des hMR vermindert Aldosteron (1 nmol/l) die β 1- und β 2-AR-induzierte CSA.

Inkubationsdauer 24 Stunden

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 6, n.o.p. 2

- hMR
- β 1-AR + hMR
- β 2-AR + hMR

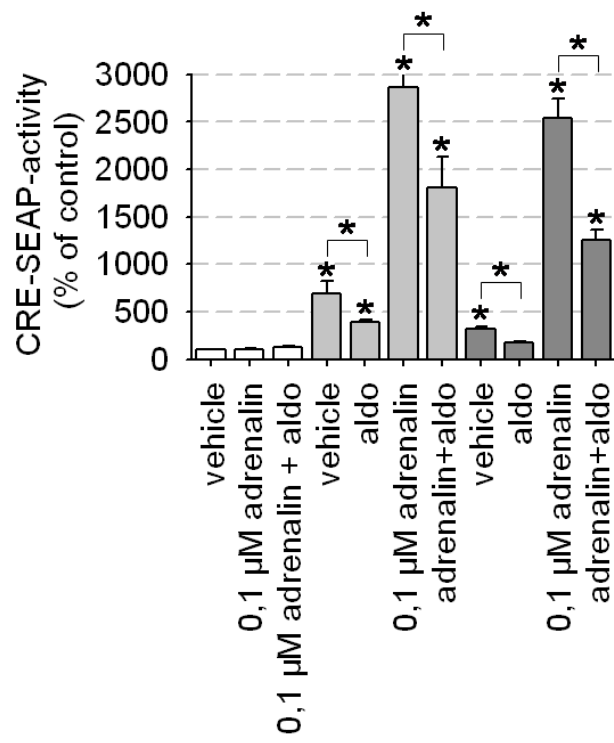


Abb. 2 D

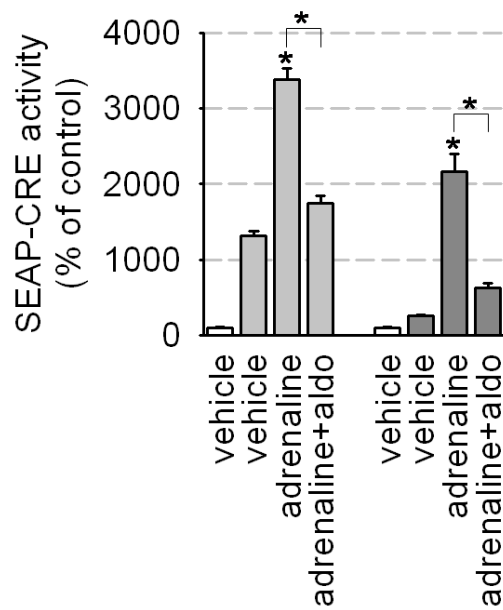
In Gegenwart des hMR vermindert Aldosteron (1 nmol/l) die β 1- und β 2-AR-induzierte CSA.

Inkubationsdauer 6 Stunden

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 6-12, n.o.p. 2-4

- hMR
- β 1-AR + hMR
- β 2-AR + hMR



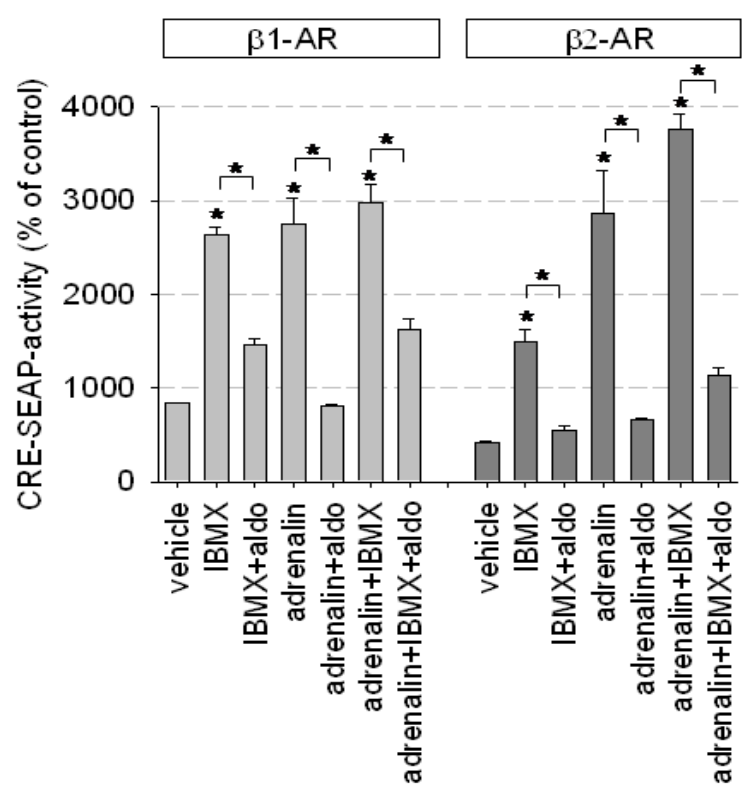
Aldosteron hemmt den cAMP-Signalweg auch bei blockiertem cAMP-Abbau

Das Molekül cAMP wird durch eine spezielle Klasse von Enzymen degradiert, die Phosphodiesterasen. Durch vermehrte Expression dieser Enzyme könnte Aldosteron die Signalübertragung des cAMP/CRE – Signalwegs verringern. Die Phosphodiesterasen können durch den Inhibitor IBMX gehemmt werden. Wenn Aldosteron die Aktivität des cAMP/CRE – Signalwegs durch vermehrte cAMP – Degradation reduziert, müsste es in Gegenwart von IBMX seinen hemmenden Effekt auf die CSA einbüßen. IBMX erhöhte die CSA in β 1- und β 2-AR – exprimierenden HEK – Zellen: die ACL wird durch autoaktivierte β -AR stimuliert und bildet cAMP; bei Suppression des cAMP-Abbaus durch IBMX akkumuliert das Molekül. Die durch Adrenalin induzierte CSA wurde ebenfalls durch IBMX verstärkt. Da die Inhibition des cAMP/CRE - Signalwegs durch Aldosteron unter IBMX erhalten blieb, ist eine vermehrte Expression von Phosphodiesterasen als dessen Ursache unwahrscheinlich.

Folgerungen:

Der Phosphodiesterase – Inhibitor IBMX unterbindet die Inhibition des vorstimulierten β 1- und β 2-AR-Signalwegs durch Aldosteron nicht. Aldosteron bewirkt die Inhibition daher nicht über eine vermehrte Expression der Phosphodiesterasen.

Abb. 3
Inhibition des cAMP – Abbaus mit 1 mmol/l IBMX unterbindet den hemmenden Effekt von 1nmol/l Aldosteron in Gegenwart des hMR auf β 1- und β 2-AR-induzierte CRE-SEAP-Aktivierung nicht.
 Inkubationsdauer 24 Stunden.
 * = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.
 N = 6, n.o.p. = 2



Die A- und B-Domänen des hMR sind für die cAMP/CRE-Inhibition wichtig

Der Mineralokortikoidrezeptor besteht, wie andere Steroidhormone auch, aus unterschiedlichen Domänen. Die N-terminalen Domänen A und B (auch NTB genannt) umfassen die Aktivatorfunktion 1 und dienen der Interaktion mit Korepressoren und Koaktivatoren. Die C-Domäne vermittelt die DNA – Bindung, die D-Domäne ist eine Gelenkregion und die Domänen E und F enthalten die Ligandenbindedomäne und die Aktivatorfunktion 2.

Um die für die Inhibition verantwortliche Domäne zu ermitteln, kamen zwei trunkierte Versionen des hMRs zum Einsatz. Der hMR^{CDEF} besitzt keine A- und B- Domänen, kann aber immer noch GRE stimulieren, der hMR^{DEF} besitzt zusätzlich keine DNA – Bindedomäne mehr und kann GRE nicht mehr stimulieren. Wenn β 1- oder β 2-AR-exprimierende HEK-Zellen mit dem hMR^{CDEF} oder dem hMR^{DEF} kotransfiziert wurden, hemmte Aldosteron den cAMP/CRE – Signalweg nicht mehr vollständig (siehe Abb. 4). Daher sind die Domänen A und B für die beschriebenen Effekte von Aldosteron wichtig.

Folgerungen:

Die hMR – Teilstücke hMR^{CDEF} und hMR^{DEF} können den cAMP/CRE-Signalweg nicht mehr vollständig hemmen. Daher sind die A- und B-Domäne des hMR für die Inhibition wichtig.

Abb. 4

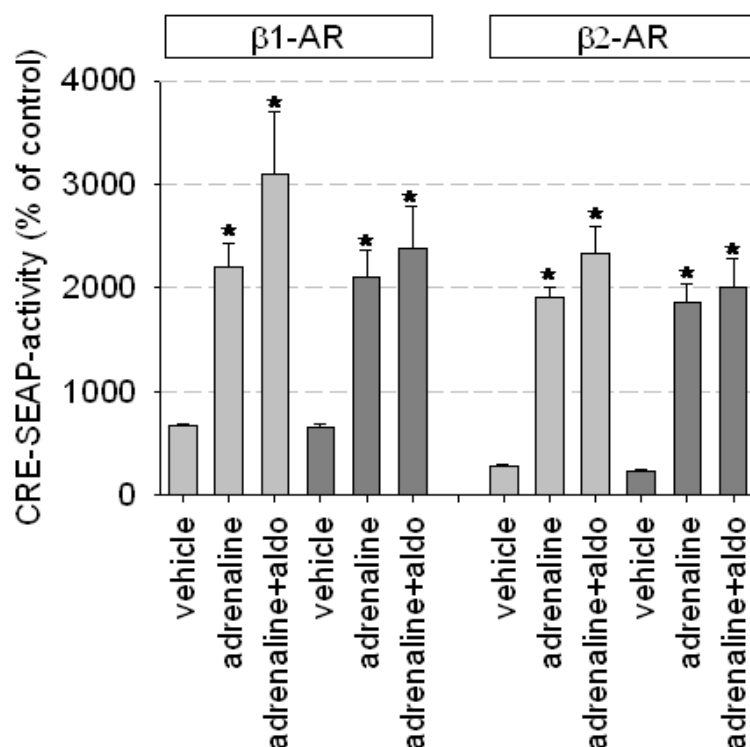
hMR-Konstrukte ohne die N-terminalen Domänen A/B (hMR-CDEF) oder ohne DNA-Bindedomäne C (hMR-DEF) besitzen keinen inhibitorischen Effekt mehr auf β 1- und β 2-AR-induzierte CRE-SEAP-Aktivierung. (Aldosteron 1 nmol/l, Adrenalin 100 nmol/l)

Inkubationsdauer 24 Stunden.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 9, n.o.p. = 3

□ hMR-CDEF
■ hMR-DEF



Aldosteron inhibiert den cAMP/CRE – Signalwegs an oder stromabwärts der ACL

An welcher Stelle des cAMP/CRE – Singalwegs bewirkt Aldosteron die Inhibiton? Die β 1- und β 2-AR aktivieren den cAMP/CRE Signalweg über G-Protein – vermittelte Stimulation der ACL. Aktiviert man die ACL direkt durch Forskolin und prüft dann, ob die CSA durch Aldosteron inhibiert wird, sind zwei Szenarien denkbar: entfällt die Inhibition, interagiert Aldosteron mit einem Element des Signalwegs oberhalb der ACL; bleibt die Inhibition jedoch bestehen, kommen die adrenergen Betarezeptoren und die G-Proteine nicht als primäres Ziel für Aldosteron in Frage; die eigentliche Interaktion bestünde in diesem Fall auf Ebene der ACL oder stromabwärts. Wenn Aldosteron auf mehreren Ebenen mit dem cAMP/CRE-Signalweg interagiert, sind andere Szenarien denkbar.

In Abb. 5A ist zu erkennen, dass Aldosteron in hMR – exprimierenden HEK – Zellen die Forskolin – induzierte CSA reduzierte. 1 nmol/l Aldosteron erzielte bereits den maximalen Effekt. Der Vergleich der Dosis-Antwortkurven in Abb. 5A legt nahe, dass Aldosteron die maximale Aktivität des cAMP/CRE – Signalwegs vermindert, während die Forskolin – Affinität nicht beeinträchtigt wird.

In HEK – Zellen, die den hMR nicht exprimieren, besaß Aldosteron keinen Effekt, genau wie der hGR – Ligand Dexamethason (Abb. 5B).

Diese Daten sind im Einklang mit den Beobachtungen in β 1- und β 2-AR – exprimierenden HEK – Zellen und zeigen entsprechend der obigen Überlegung, dass der hauptsächliche Ort der Interaktion zwischen cAMP/CRE und Aldosteron auf der Ebene der ACL oder stromabwärts liegen muss. Die Inhibition der Forskolin-induzierten CSA durch Aldosteron konnte bereits nach 2 Stunden beobachtet werden (Abb. 5C).

Folgerungen:

Aldosteron vermindert die Forskolin-induzierte CRE-SEAP-Aktivierung in Gegenwart des hMR. Damit sind die adrenergen Betarezeptoren und G-Proteine nicht das primäre Target von Aldosteron. Dexamethason hat keinen Effekt.

Abb. 5 A

Aldosteron vermindert die CRE-SEAP-Aktivität in hMR-exprimierenden HEK-Zellen.

Inkubationsdauer 24 Stunden.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

$N = 9, n.o.p. = 3$

$EC_{50}(con) \sim 2,7 \mu mol/l$
 $EC_{50}(aldo) \sim 2,8 \mu mol/l$
 $E_{max}(con) \sim 2284\%$
 $E_{max}(aldo) \sim 1371\%$

- – Aldosteron
- + 100 nM Aldosteron
- ◐ + 1 nM Aldosteron

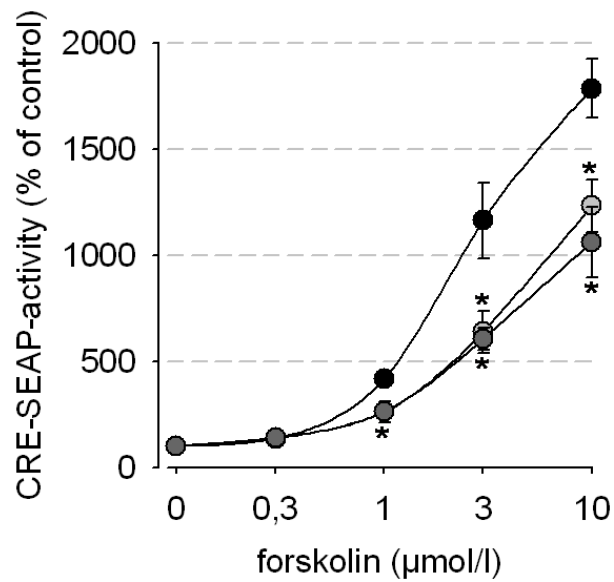


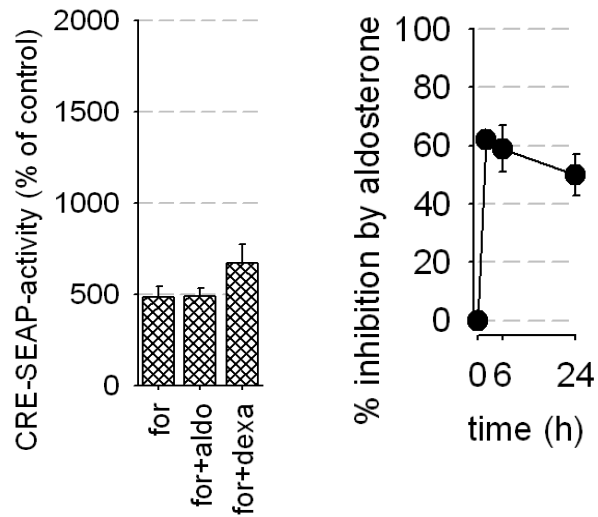
Abb. 5 B, links

In Abwesenheit des hMR ist dies nicht länger der Fall.

$N = 6, n.o.p. = 2$

Abb. 5 C, rechts

Die Inhibition durch Aldosteron war nach 120 Minuten bereits vollständig ausgeprägt.



Aldosteron vermindert die cAMP-Produktion der Adenylatzyklase geringfügig

Wenn Aldosteron den cAMP/CRE – Signalweg durch Reduktion der Enzymaktivität der ACL hemmt, sollte eine verminderte cAMP – Bildung nachzuweisen sein. Aldosteron reduzierte basale cAMP – Spiegel nicht, obwohl nach 6 Stunden eine Tendenz zur Verminderung des cAMPs bestand (Abb. 6A). Wurde jedoch die ACL mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin zur cAMP – Produktion stimuliert, reduzierte Aldosteron die cAMP – Konzentration in hMR – exprimierenden HEK – Zellen in gewissem Ausmaß. In Wildtyp-HEK-Zellen fehlte dieser Effekt (Abb. 6B). Diese Daten legen nahe, dass Aldosteron und der hMR die ACL – Aktivität in geringem Umfang vermindern können.

Zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese wurden HEK-hMR – Zellen für unterschiedliche Zeit mit entweder 1 nmol/l Aldosteron oder Vehikel inkubiert (Abb. 6C). Am Ende der Vorinkubationsperiode wurde die cAMP-Bildung für 10 Minuten durch 10 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin + 1 mmol/l IBMX stimuliert. Unter diesen Bedingungen lässt sich die initiale cAMP – Bildungsrate ohne signifikante Degradation und damit näherungsweise die Aktivität der ACL bestimmen. Abb. 6C zeigt, dass Aldosteron nach einer Latenzphase von die cAMP – Bildungsrate leicht, aber signifikant verminderte. Dieser Effekt zeigte sich bereits nach ca. 120 Minuten.

In der Gegenwart von 10 μmol Cycloheximid (Abb. 6D), einem Inhibitor der Proteinsynthese, rief Aldosteron keinen signifikanten Effekt hervor. Der Inhibition liegt also anscheinend ein genomischer Mechanismus zu Grunde.

Folgerungen:

- *Aldosteron vermindert die Forskolin-induzierte cAMP-Produktion der ACL geringfügig.*
- *Cycloheximid hebt die Inhibition der ACL durch Aldosteron auf. Es handelt sich also anscheinend um einen genomischen Effekt.*

Abb. 6 A

cAMP – Konzentration in HEK-hMR-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin und/oder 1 nmol/l Aldosteron.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 3-9, n.o.p. = 1-3

- Kontrolle
- 1 nmol/l Aldosteron
- 1 $\mu\text{mol/l}$ Forskolin
- Aldosteron + Forskolin

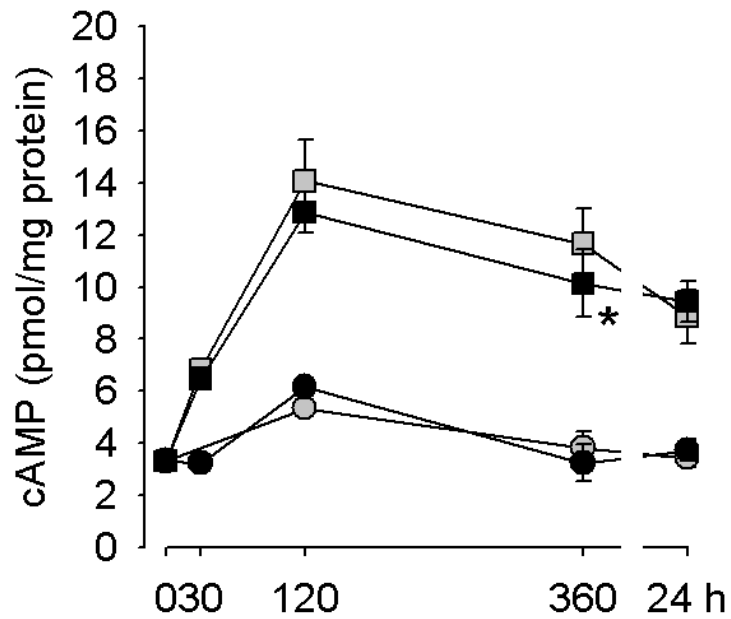


Abb. 6 B, links

In Abwesenheit des hMR senkte Aldosteron die cAMP-Konzentration nicht.

Inkubationsdauer 6 Stunden.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.

N = 6, n.o.p. = 2

Abb. 6 C, rechts

Initiale Forskolin-induzierte cAMP-Bildung in Gegenwart von 1 mmol/l IBMX („Aktivität der Adenylatzyklase“) nach unterschiedlicher Inkubationszeit mit Aldosteron.

N = 6, n.o.p. = 2

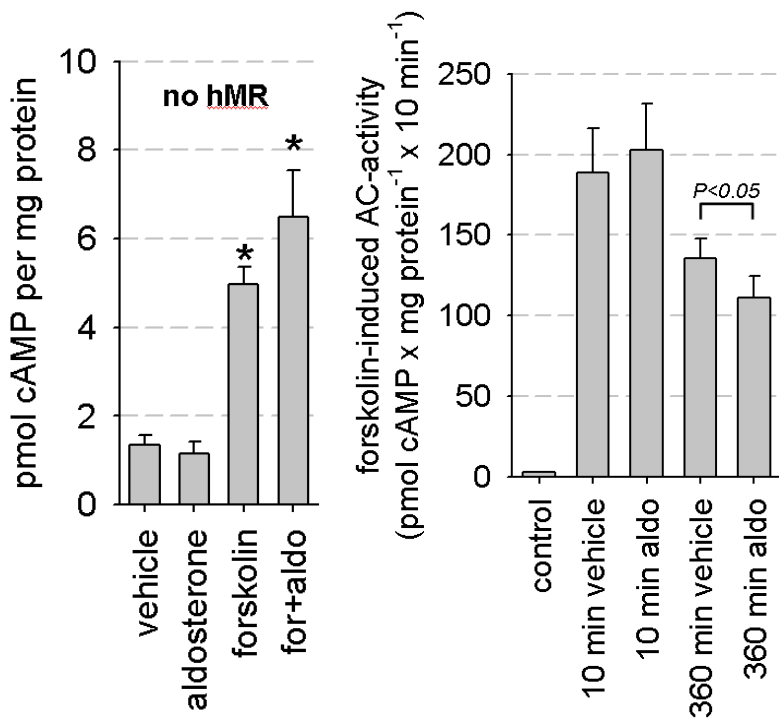
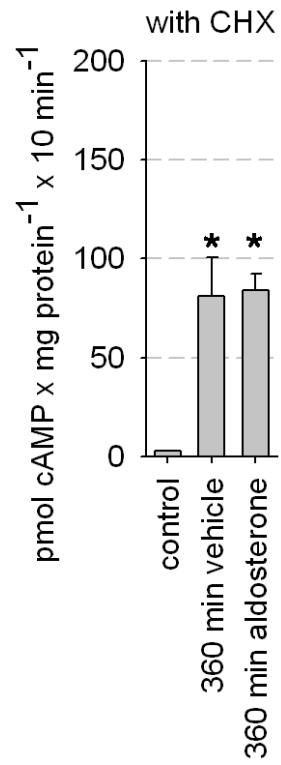


Abb. 6 D

Initiale Forskolin-induzierte cAMP-Bildung in Gegenwart von 1 mmol/l IBMX („Aktivität der Adenylatzyklase“) nach 6 Stunden Inkubation mit 1 nmol/l Aldosteron und 10 μ mol/l Cyclohexamid (CHX).

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle.
N = 6, n.o.p. = 2



Aldosteron/hMR inhibiert die CRE-Aktivierung durch db-cAMP

Findet die durch Aldosteron vermittelte Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs allein auf der Ebene der Adenylatzyklase statt, sollte Aldosteron die CRE-Aktivierung durch exogen zugeführtes cAMP (membrangängiges db-cAMP) nicht beeinflussen. Abb. 7A zeigt, dass dies jedoch der Fall war. Die Dosis-Antwort Kurve von db-cAMP wurde in HEK-hMR-Zellen durch Aldosteron vermindert. Die Expression von CREB war unverändert (Abb. 7B). Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass auch unterhalb der Adenylatzyklase eine Inhibition von Aldosteron auf cAMP/CRE Signaling besteht.

Folgerungen:

Aldosteron hemmt die CRE-Aktivierung durch cAMP; daher besteht auf Ebene des cAMPs oder stromabwärts eine Transaktivierung.

Abb. 7 A

Aldosteron vermindert die CRE-SEAP-Aktivierung durch membran-permeables cAMP (db-cAMP) in hMR-exprimierenden HEK.

*n = 9
n.o.p. = 3*

○ – Aldosteron
● + 1 nM Aldosteron

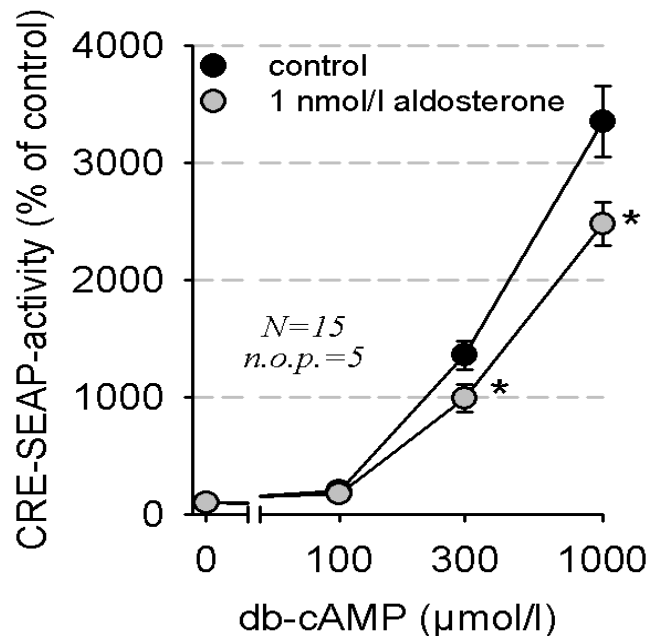
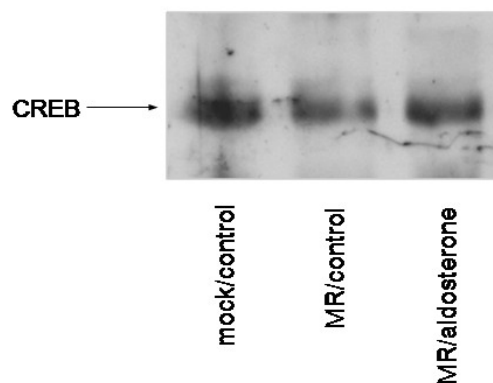


Abb. 7 B

Die Expression von des Proteins CREB wurde durch Aldosteron nicht signifikant verändert.



Ca²⁺ besitzt vermutlich eine Bedeutung für die Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron

Calcium ist ein wichtiges Signalmolekül bei einer Reihe von Signalwegen; könnte auch der cAMP/CRE-Inhibition ein Calcium-vermittelter Mechanismus zu Grunde liegen?

Die Proteinkinase C (PKC) wird u. a. durch Ca²⁺ aktiviert und spaltet sich dann in eine regulatorische und eine katalytische Domäne. Die katalytische Untereinheit der PKC kann wiederum andere Proteine phosphorylieren (z. B. mit regulatorischer Funktion) und so in die Aldosteron-vermittelte Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs eingreifen. Mit Bisindolylmaleimide (BIM) kann die PKC inhibiert werden; vermindert sich dadurch die Aldosteron-vermittelte Inhibition, ist dies ein Hinweis auf eine Beteiligung der PKC.

BAPTA-AM ist ein Ca²⁺-Chelator, der Änderungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration abpuffert. Nimmt in Gegenwart von BAPTA-AM die Aldosteron-vermittelte CSA – Inhibition ab, ist dies ein Hinweis, dass die Änderung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration eine Rolle für die Aldosteron-vermittelte Inhibition besitzt.

Ionomycin ist ein Ionophor, das im geeigneten Medium zu Ca²⁺-Einstrom in Zellen führt. Es soll hier die Abhängigkeit der cAMP/CRE – Inhibition vom Ca²⁺-Einstrom untersuchen.

Weder die Inhibition der Proteinkinase C durch BIM noch die Abpufferung des zytosolischen Ca²⁺ mit BAPTA-AM unterband die CSA - Inhibition durch Aldosteron in HEK-Zellen (Abb. 8). Damit scheint sowohl eine PKC-, als auch eine durch Modulation der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration vermittelte Inhibition unwahrscheinlich.

Auf der anderen Seite hemmte Ionomycin die Forskolin-induzierte CSA. Dieser Effekt schien nicht mit Aldosteron additiv zu sein; es könnte sich also um denselben Mechanismus handeln.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Calcium an der Aldosteron-vermittelten CSA – Inhibition beteiligt ist. Es erscheint wahrscheinlicher, dass erhöhter Calcium-Einstrom oder erhöhtes Gesamtcalcium beteiligt sind als eine Modulation der zytosolischen Calciumkonzentration.

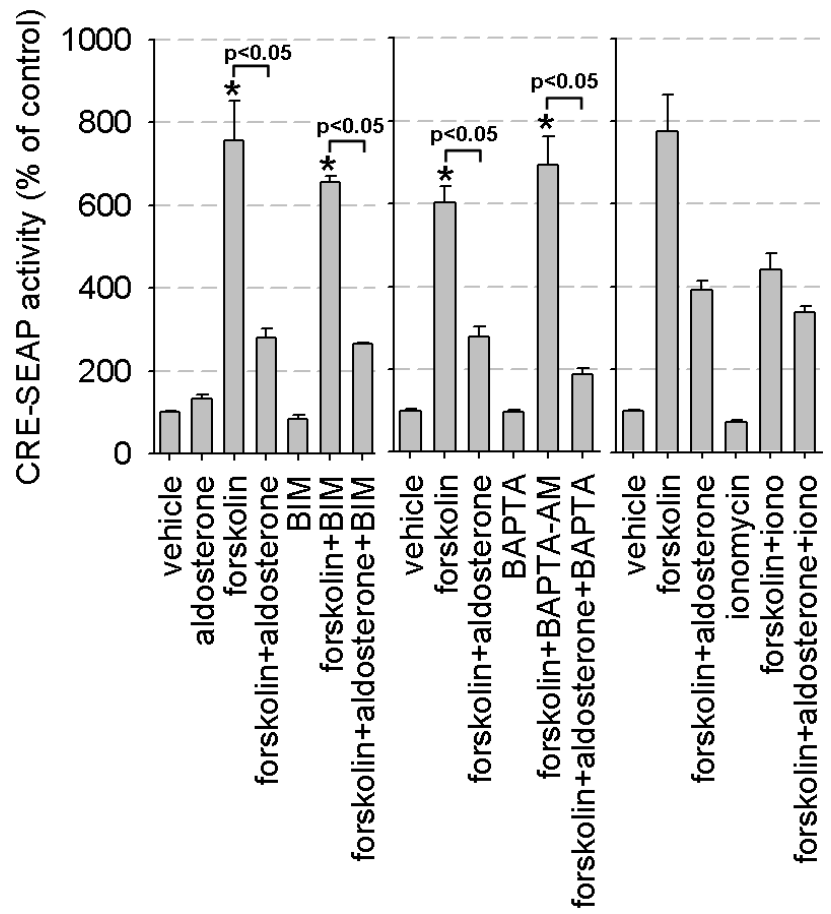
Folgerungen:

Ca²⁺ scheint eine Rolle bei der Inhibition zu spielen. Eine Veränderung der zytosolischen Konzentration erscheint weniger wahrscheinlich als eine Veränderung des Einstroms oder des Gesamtgehaltes in der Zelle. Es fanden sich keine Hinweise darauf, dass die PKC an der Inhibition beteiligt ist.

Abb. 8

Aldosteron-induzierte Inhibition der Forskolin-stimulierten CSA in Gegenwart von 200 nmol/l BIM (PKC-Inhibitor), 50 µmol/l BAPTA-AM (Ca²⁺ - Puffer)

*N = 9-12
n.o.p. 3-4*



G_i-Proteine sind nicht an der Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron beteiligt

G_i – Proteine sind physiologisch u. a. an Betarezeptoren gekoppelt. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, tauscht die α -Untereinheit des G-Proteins ein gebundenes GDP gegen GTP aus. Das G-Protein spaltet sich darauf hin in α - und $\beta\gamma$ - Untereinheiten, die vom Rezeptor dislozieren. Die α_i - Untereinheiten translozieren an die ACL, die sie inhibieren. Könnte die beobachtete CSA - Inhibition durch eine Aldosteron-vermittelte Amplifizierung des G_i-Protein-Effekts zu Stande kommen, z. B. durch vermehrte Expression, verbesserte Translokation oder Affinität zur ACL?

Ist dies der Fall, müsste die Inhibition durch Ausschalten der G_i-Proteine aufzuheben sein. Inhibition der G_i-Proteine mit Pertussis-Toxin (PTX) unterband die Inhibition durch Aldosteron nicht (Abb. 9). Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass Aldosteron die Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch G_i-Proteine bewirkt.

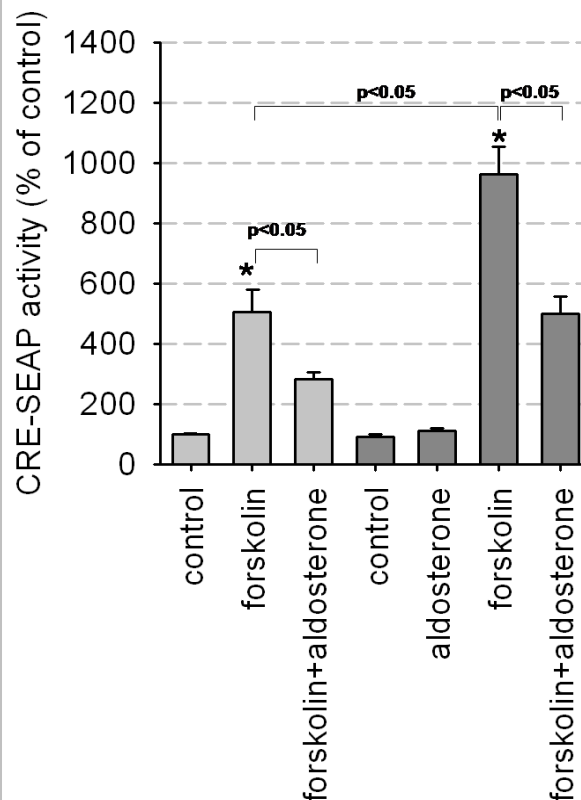
Folgerungen:

Gi-Proteine scheinen an der Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron nicht beteiligt zu sein,

Abb. 9

Aldosteron-induzierte Inhibition der Forskolin-stimulierten CSA in Zellen, die mit dem Gi-Protein-Inhibitor Pertussis-Toxin (PTX) inkubiert wurden (0.1 mg/l PTX, 5-stündige Vorinkubation).

□ - PTX
■ + PTX



Aldosteron inhibiert Forskolin-stimuliertes cAMP/CRE-Signaling auch in glatten hAoSMCs

Bisher wurde die Transaktivierung zwischen dem cAMP/CRE – Signalweg mit Aldosteron/hMR in einem heterologen Expressionssystem untersucht; da aber Aldosteron an pathologischen Vorgängen in Gefäßmuskelzellen beteiligt ist, liegt nahe, die inhibitorische Interaktion mit dem cAMP/CRE-Signalweg auch in glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC) nachweisen. Zu diesem Zweck wurde eine Primärkultur aus der menschlichen Aorta (human aortic smooth vascular muscle cells, hAoSMC) verwendet. In hAoSMC wurde zuvor die Expression des hMRs berichtet. In diesen Zellen wurde die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung durch 1nmol/l Aldosteron nicht vermindert (Abb. 10A); die CSA konnte jedoch genau wie in HEK-Zellen durch Aldosteron signifikant vermindert werden (Abb. 10B). Die Interaktion zwischen Aldosteron und dem stimulierten cAMP/CRE – Signalweg findet also auch in menschlichen hAoSMC statt.

Durch Western Blot wurde untersucht, ob die Aldosteron-vermittelte Inhibition durch eine Reduktion des phosphorylierten CREB zu Stande kommt. Wie aus Abb. 10C ersichtlich ist, induzierte Forskolin die Phosphorylierung von CREB. Aldosteron verminderte Forskolin-induziertes pCREB. Eine Aldosteron-vermittelte Reduktion der CREB-Phosphorylierung könnte also zur Inhibition beitragen.

Folgerungen:

- *Aldosteron inhibiert auch in hAoSMC die Forskolin-induzierte CSA.*
- *Forskolin-induzierte CREB-Phosphorylierung wurde durch Aldosteron vermindert.*

Abb. 10 A, links

Aldosteron vermindert die Forskolin-induzierte cAMP-Bildung in hAoSMC nicht.

Inkubationszeit 24 Stunden

N = 6
n.o.p. = 2

Abb. 10 B, rechts

Aldosteron vermindert die Forskolin-induzierte CSA in hAoSMC.

N = 6
n.o.p. = 2

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle

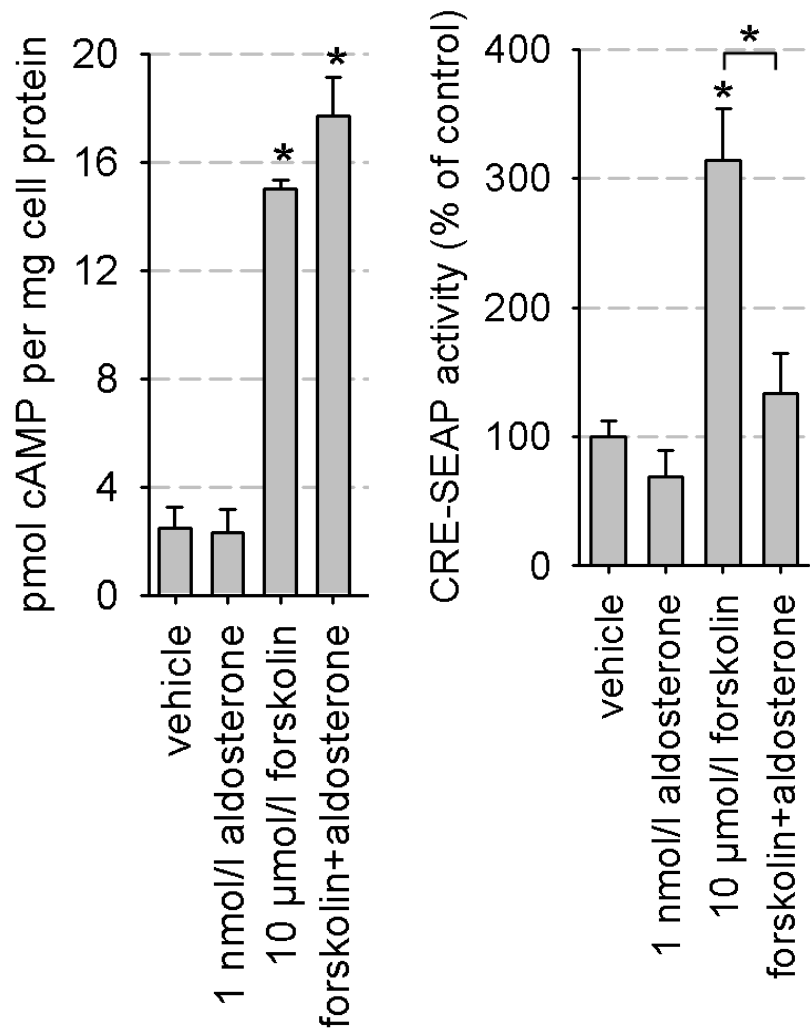
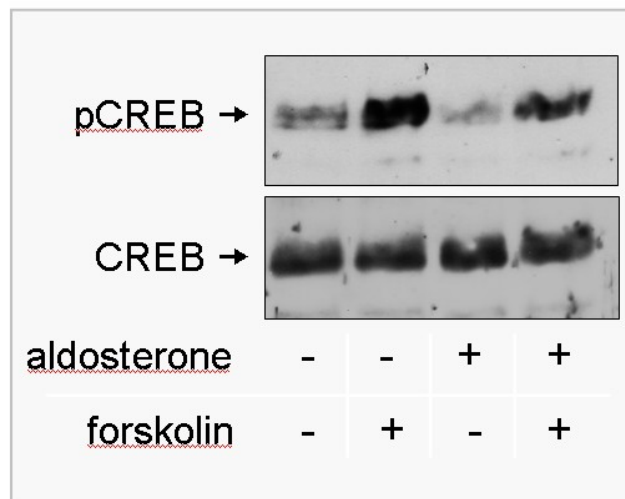


Abb. 10 C

Aldosteron vermindert die Forskolin-induzierte CREB-Phosphorylierung in hAoSMC geringfügig.

* = $p < 0,05$ gegen Kontrolle



Aldosteron vermindert die Forskolin- und Adrenalin-induzierte Inhibition der Kollagen I – Sekretion in hAoSMCs

Aldosteron kann in glatten Gefäßmuskelzellen den cAMP/CRE-Signalweg inhibieren, aber besitzt dieser Befund auch eine pathophysiologische Relevanz? Der cAMP/CRE – Signalweg besitzt antifibrotische Eigenschaften [50]. Durch Stimulation des cAMP/CRE-Signalwegs mit Forskolin sollte die Kollagensekretion sinken. Aldosteron hingegen sollte entsprechend den bisherigen Beobachtungen die Kollagensekretion steigern.

Dementsprechend wurde der Einfluss von Forskolin, Adrenalin und Aldosteron auf die Kollagen I – Sekretion in HAoSMC-Zellen bestimmt. Forskolin (10 µmol) oder Adrenalin (100 nmol/l) verminderten die Kollagensekretion signifikant und bestätigten damit die antifibrotische Aktivität von cAMP.

Der antifibrotische Effekt wurde durch Aldosteron signifikant abgeschwächt (Abb. 11 A-B). Deshalb besitzt Aldosteron einen indirekten fibrotischen Effekt, wenn die cAMP-Bildung stimuliert wird.

Folgerungen:

- *Forskolin und Adrenalin reduzieren die Kollagen-I-Sekretion in hAoSMC.*
- *Aldosteron steigert bei durch Forskolin oder Adrenalin vorstimulierten cAMP/CRE-Signalweg die Kollagen-I-Sekretion.*

Abb. 11 A

Aldosteron vermindert die Forskolin- induzierte Hemmung der Kollagen I – Sekretion in hAOSMC.

- *Vehikel*
- *Aldosteron*

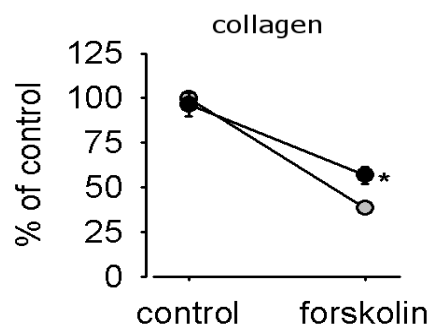
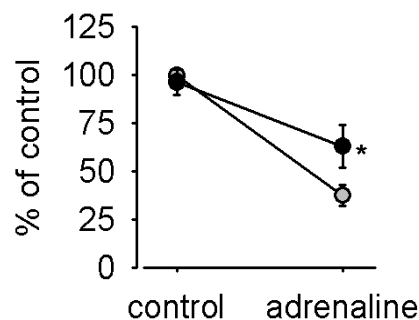


Abb. 11 B

Aldosteron vermindert die Adrenalin- induzierte Hemmung der Kollagen I – Sekretion in hAOSMC.



Diskussion

Dem klassischen Modell nach sind Steroidhormone membrangängig und binden im Zytoplasma an einen spezifischen Rezeptor, von dem daraufhin Hitzeschockproteine dissoziieren und die Dimerisierung des Rezeptors mit einem zweiten Rezeptor ermöglichen. Die Rezeptordimere translozieren in den Nukleus, wo sie als Aktivatoren oder Repressoren mit einer gewissen Latenzzeit genomische Effekte hervorrufen.

Inzwischen gibt es jedoch vielfältige Indizien für von diesem Schema abweichende, neuartige Effekte von Steroidhormonen, die im Minutenbereich auftreten und deshalb vermutlich nicht durch genomische Mechanismen zu erklären sind. Derartige „schnelle“ Effekte können z. B. durch Interaktionen der zytoplasmatischen Rezeptoren mit anderen Signalnetzwerken zu Stande kommen. So wurde für den ER eine bidirektionale Kommunikation mit dem EGFR beschrieben [51]; letzterer besitzt auch Wechselwirkungen mit dem hMR [52].

Weiterhin hat sich gezeigt, dass mehrere Steroidhormone nicht nur zytoplasmatische, sondern auch Membranrezeptoren besitzen, die schnelle Effekte vermitteln können. Dazu zählen Östrogen und Progesteron [53][54], und auch für Androgene und Glukokortikoide scheint die Existenz eines Membranrezeptors möglich [55][56][57][58][59]. Hingegen bleibt unklar, ob es einen membranständigen Mineralokortikoidrezeptor gibt; es wurde jedoch kürzlich die Existenz eines niedrig-affinen Membranrezeptors im Hirngewebe berichtet [60].

Wenn der Mineralokortikoidrezeptor mit dem EGFR kommuniziert, könnte es dann weitere Wechselwirkungen mit anderen zentralen Signalkaskaden geben, wie z. B. mit dem cAMP/CRE-Signalweg? Bisher wurden erst wenige Wechselwirkungen beschrieben. Dabei scheint geklärt zu sein, dass in der einen Richtung der cAMP/CRE-Signalweg die Transkriptionsaktivität des hMR steigert [42]. Umgekehrt jedoch ist die Wirkung von Aldosteron/ hMR auf den cAMP/CRE-Signalweg noch unverstanden und die vorliegenden Daten sind zum Teil widersprüchlich.

Berichtet wurde sowohl von schneller, Aldosteron-induzierter, hMR-unabhängiger [38] [39], aber auch von Aldosteron-induzierter, hMR-abhängiger cAMP-Bildung [43]; außerdem wurde eine Aldosteron-unabhängige, durch die alleinige Anwesenheit des hMR hervorgerufene Erhöhung von cAMP nach Gabe von Isoproterenol [41] beobachtet.

Eine andere Studie hingegen beobachtete, dass hMR die Affinität von CREB und ATF auf CRE reduziert [37].

Wiederum eine andere Studie konnte keine Kommunikation [40] der Signalwege feststellen, eine weitere sah keine direkte Kommunikation, aber dass sowohl Aldosteron, als auch cAMP die Expression der Na⁺/K⁺-ATPase induzierten und das entsprechende Gen daher möglicherweise über die gleiche Signalendstrecke aktiviert wird [44].

Für cAMP, ein zentrales Signalmolekül des cAMP/CRE-Signalwegs, wurden antifibrotische Effekte beschrieben. Insel et al. stimulierten mit TGF- β oder Angiotensin II die Expression von glattem α -Muskelaktin und Kollagen in kardialen Fibroblasten. Sowohl Forskolin, als auch membrangängiges cAMP verminderten die α -Muskelaktin- und Kollagensekretion [50]. In einer weiteren Studie wurde analog in humanen Lungenfibroblasten eine cAMP-vermittelte Reduktion der Kollagensekretion nachgewiesen [61]. Hsieh et al. sahen in einer Studie an VSMC den cAMP/CRE-Signalweg als Mediator der antifibrotischen Wirkung von Pentoxifyllin (PTX) [62].

Besteht also eine Interaktion zwischen Aldosteron, hMR und dem cAMP/CRE-Signalweg, könnte Aldosteron auf diesem Wege sekundär pro- oder antifibrotische Effekte ausüben. Dementsprechend könnte Aldosteron durch eine Inhibition des cAMP-Signalwegs kardiale oder vaskuläre Fibrosen induzieren und erhöhte Ventrikelsteifigkeit, diastolische Füllungsstörung sowie verminderte vaskuläre Compliance verursachen.

Weiterhin könnte durch die Kommunikation von Aldosteron mit dem cAMP/CRE-Signalweg die α 1-AR/ β -AR-Balance verschoben werden. Bei Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs würde eine Selektion zu Gunsten α 1-AR-vermittelter Signale auftreten. Das Resultat wäre ein erhöhter arterieller Vasotonus und peripherer Widerstand. Aufgrund gesteigerter Herzarbeit kann kompensatorisch eine konzentrische Herzmuskelhypertrophie entstehen, die im Herzversagen eskalieren kann.

Für Spironolacton wurden vasorelaxierende Effekte beschrieben [63]; eine α 1-AR/ β -AR-Dysbalance könnte an den pathophysiologischen Vorgängen, die zu erhöhtem Vasotonus führen, beteiligt sein.

Als Ziele dieser Doktorarbeit waren angesetzt:

1. Interagieren Aldosteron und der hMR mit dem ruhenden cAMP/CRE – Signalweg?
2. Interagieren Aldosteron und der hMR mit dem durch FSK oder Adrenalin stimulierten cAMP/CRE – Signalweg?
3. Auf welcher Ebene und durch welchen Mechanismus kommt die Interaktion zu Stande?
4. Beeinflusst diese Interaktion die Kollagensekretion in VSMC?

1. Aldosteron und der hMR besitzen keinen ausgeprägten Einfluss auf den ruhenden cAMP/CRE-Signalweg

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Aldosteron in HEK-293-Zellen unter Basalbedingungen, d.h. wenn der cAMP/CRE-Signalweg nicht über β -AR oder die ACL stimuliert wurde, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit des hMR nur einen unwesentlichen Einfluß auf die cAMP/CRE – Signaltransduktion hat. Es wurde durch Aldosteron weder eine wesentliche Veränderung der CRE-Aktivierung, noch der Ruhe-cAMP-Level beobachtet.

In einer Reihe von Publikationen hingegen wurden Effekte von Aldosteron auf den ruhenden cAMP/CRE-Signalweg beobachtet. Wehling et al. beschrieben einen Aldosteron-induzierten, hMR-unabhängigen, innerhalb einer Minute einsetzenden cAMP-Anstieg in Mausepidermiszellen und VSMC [38][39]; Balment et al. konnten am inneren medullären Sammelrohr, dessen Zellen den hMR exprimieren, durch Aldosteron eine dosisabhängige cAMP-Erhöhung innerhalb von vier Minuten auslösen [43].

Die abweichenden Ergebnisse der Doktorarbeit gegenüber den beschriebenen Studien lässt sich durch die unterschiedliche Aldosteronempfindlichkeit der jeweils verwandten Zelllinien erklären. Weiterhin verwandten Wehling et al. Aldosteron in einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$; die in der hier vorgelegten Arbeit beschriebenen Effekte traten hingegen bereits bei einer Konzentration von 1 nmol/l auf. Weiterhin wurde in dieser Arbeit zur Bestimmung der Ruhe-cAMP-Konzentration kein IBMX eingesetzt; es ist daher möglich, dass geringfügige cAMP-Anstiege sofort durch vermehrten Abbau kompensiert wurden und ohne Hemmung der Phosphodiesterasen nicht entdeckt wurden. Um diese Unklarheit zu beseitigen, wurde die Ruhekonzentration von cAMP in Gegenwart von IBMX erneut bestimmt; wieder erzeugte Aldosteron keinen signifikanten cAMP-Anstieg. Auch die Resultate des CRE-Reporter-Assays bestätigen dies.

2. Aldosteron hemmt den aktivierten cAMP/CRE-Signalweg

Wurde der cAMP/CRE-Signalweg über β -AR, die ACL oder direkte cAMP-Gabe vorstimuliert, hemmte Aldosteron die CRE-Aktivierung in Gegenwart des hMR signifikant.

Die Reduzierung der CRE-Aktivierung steht im Einklang mit und könnte durch die Vermutung von Ahmad/Metford erklärt werden, dass der hMR an ATF/CREB bindet und deren Affinität für CRE-Elemente reduziert [37], mit der Einschränkung, dass in der beschriebenen Studie allein die Präsenz des hMR ohne Aldosteron ausreichend war.

Die Ergebnisse dieser Arbeit scheinen im Widerspruch zur Stimulation von cAMP-induzierbarer Renin-Expression durch Aldosteron in Gegenwart des hMR zu stehen [40]. In dieser Studie von Kurtz et al. wurde jedoch Aldosteron in einer Konzentration von 100 nmol/l verwandt und der für die Stimulation verantwortliche Mechanismus umfasste die Stabilisation der Renin-mRNA, und nicht etwa eine Modulation des cAMP/CRE-Signalwegs; eine direkte Interaktion der Signalwege wurde also nicht nachgewiesen.

Den Ergebnissen der Arbeit zu Folge sind sowohl die A-, als auch die B-Domäne des hMR für die Inhibition wichtig.

3. Die Interaktion erfolgt hauptsächlich stromabwärts der ACL, vermutlich durch Verminderung von pCREB

Da nicht nur die durch Adrenalin, sondern auch Forskolin induzierte CSA durch Aldosteron inhibieren lässt, scheint der primäre Ort der Inhibition auf Ebene der ACL oder stromabwärts zu liegen.

Dementsprechend konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass die Ausschaltung der G_r -Proteine durch PTX den beschriebenen Effekt unbeeinträchtigt ließ.

Um zu überprüfen, ob Aldosteron eine Inhibition auf Ebene der ACL bewirkt, wurde in der Arbeit die Bildung von cAMP an der ACL durch Forskolin und nach Beigabe von Aldosteron gemessen. Aldosteron verminderte die cAMP-Bildung an der durch Forskolin stimulierten ACL lediglich geringfügig. Eine Interaktion von Aldosteron mit dem cAMP/CRE-Signalweg auf Ebene der ACLen wäre sehr effizient, da die ACLen der Umsatz-limitierende Faktor z. B. in β -adrenerger Signaltransduktion sind [64], aber für den hier beschriebenen Effekt scheinen sie nicht ausschlaggebend zu sein.

Die PKC, ein Enzym, das die ACL modulieren kann, scheint nicht beteiligt zu sein, denn die Ausschaltung des Enzyms mit BIM besaß keinen Einfluß auf den Effekt. Der Einstrom von oder zelluläre Gesamtgehalt an Calcium-Ionen hingegen scheint an der Inhibition beteiligt zu sein, da Ionomycin den Effekt von Aldosteron imitierte, ohne additiv zu wirken. Der

exakte Mechanismus der Inhibition durch Ionomycin, und in welchem Ausmaß eine Übereinstimmung zu Aldosteron besteht, wurde nicht weiter untersucht.

Die Inhibition des cAMP/CRE-Signalweg könnte auch durch eine Beschleunigung des cAMP-Abbaus bewirkt werden. Der beschriebene Effekt blieb aber auch bei Zugabe von IBMX bestehen, das die für den cAMP -Abbau verantwortlichen Phosphodiesterasen hemmt.

Aldosteron könnte den cAMP/CRE-Signalweg durch Reduktion des phosphorylierten cAMP-responsive binding protein (pCREB) hemmen. CREB ist der klassische Transkriptionsfaktor am CRE und wird in Folge einer cAMP-Bildung phosphoryliert, und zwar indem cAMP die PKA in zwei katalytische und zwei regulatorische Domänen spaltet. Die regulatorischen Untereinheiten phosphorylieren CREB. Das pCREB bildet Dimere, die an CRE-Elemente binden und genomische Effekte vermitteln.

Zum einen könnte die Konzentration von pCREB durch verminderte CREB-Phosphorylierung gesenkt werden, zum Beispiel durch direkte Inhibition der PKA oder durch räumlicher Distanzierung zwischen dem Enzym und CREB; zum anderen könnte Aldosteron die Aktivität des Signalwegs durch vermehrte pCREB-Dephosphorylierung reduzieren, z. B. durch vermehrte Expression oder Aktivierung von Phosphatasen.

Im Western Blot zeigte sich, dass Aldosteron die Forskolin-induzierte Konzentration von pCREB vermindert. Damit bleibt zwar unklar, ob Phosphorylierung, Dephosphorylierung oder auch beide Stellgrößen modifiziert werden, aber ein wichtiges Ziel für die Interaktion mit der Signalkaskade scheint damit identifiziert zu sein.

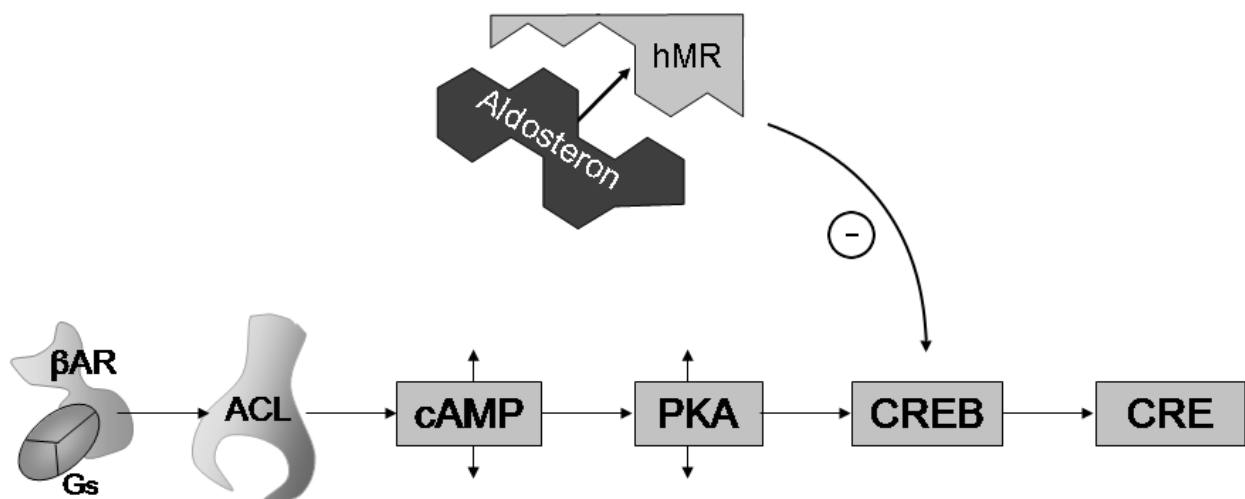
Die Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs durch Aldosteron könnte weiterhin dadurch zu Stande kommen, dass Aldosteron die Bindung von pCREB an CRE behindert, wie bereits durch Ahmad und Metford beschrieben [37]. Sie konnten einen PUC-1/pB1CAT reporter assay mit cAMP stimulieren. Der hemmende Effekt von Aldosteron auf diese Versuchsanordnung kam DNA-Bindestudien zu Folge durch eine hMR/CREB-Interaktion zu Stande. Ob auch die in dieser Arbeit beobachtete Inhibition teilweise über diesen Mechanismus zu Stande kommt, wurde nicht geklärt.

Unklar bleibt auch, ob ein schneller oder ein klassischer, genomischer Mechanismus der Inhibition zu Grunde liegt. Die Effekte von Aldosteron wurden frühestens nach 120 Minuten gemessen. Schnelle Effekte, wie in den zuvor erwähnten Studien [38][39][43], sind nicht ausgeschlossen. Da Cyclohexamid die Inhibition durch Aldosteron aufhob, scheint ein genomischer Mechanismus jedoch wahrscheinlich.

4. Beeinflusst diese Interaktion die Kollagensekretion in VSMC?

Die negative Wechselwirkung zwischen Aldosteron und dem cAMP/CRE-Signalweg konnte nicht nur im kontrollierten Modell aus HEK-Zellen mit transfiziertem hMR nachgewiesen werden, sondern auch in glatten Gefäßmuskelzellen vom Menschen.

In der Doktorarbeit wurde in human aortic smooth muscle cells (hAoSMC) überprüft, ob Aldosteron eine durch cAMP reduzierte Kollagenproduktion wieder erhöht. Sowohl Forskolin als auch Adrenalin führten zu einer verminderten Kollagen I – Sekretion, wie zuvor berichtet [50][61][62]. Diese „antifibrotische“ Wirkung wurde durch Aldosteron signifikant vermindert. Es scheint also möglich, dass Aldosteron in physiologischer Umgebung, wenn eine gewisse Stimulation des cAMP/CRE – Signalwegs besteht, die Kollagensekretion im Sinne einer Disinhibition steigert.



Zusammenfassung

Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor regulieren physiologisch den Blutdruck sowie die Salz- und Volumenhomöostase, besitzen aber auch eine entscheidende Rolle bei pathologischen Prozessen im kardiovaskulären System. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Aldosteron perivaskuläre und interstitielle kardiale Kollagenvermehrung induziert und zu linksventrikulärer Hypertrophie führt. Um dies zu verhindern, werden hMR-Inhibitoren inzwischen in der Therapie und zur Vorbeugung der Herzinsuffizienz nach akutem Herzinfarkt mit Erfolg eingesetzt.

Der genaue Mechanismus, durch den Aldosteron und der hMR eine Fibrose bewirken, ist bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine Interaktion mit dem über β -AR aktivierten cAMP/CRE-Signalweg, der z. B. bei Herzinsuffizienz stark stimuliert wird, zu den pathophysiologischen Vorgängen beiträgt.

Es konnte gezeigt werden, dass Aldosteron in Gegenwart des hMR die Signaltransduktion des cAMP/CRE-Signalwegs abschwächen kann. Bisher scheint der wichtigste Mechanismus, durch den Aldosteron den Signalweg hemmt, eine Verminderung von pCREB zu sein. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die A- und die B-Domäne des hMR für die Inhibition wichtig sind.

Für cAMP werden antifibrotische Effekte beschrieben, eine durch Aldosteron verminderte Produktion von cAMP sollte daher eine Zunahme der Kollagensekretion bedeuten. In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass eine durch Adrenalin verminderte Kollagensekretion (Typ I) in glatten Gefäßmuskelzellen durch Aldosteron im Sinne einer Disinhibition wieder gesteigert wird.

Zusammenfassend wurde in dieser Doktorarbeit demonstriert, dass die Inhibition des cAMP/CRE-Signalwegs eine Möglichkeit ist, wie Aldosteron und der Mineralokortikoidrezeptor z. B. im Szenario einer Herzinsuffizienz zu interstitieller Kollagenvermehrung beitragen können.

Literaturverzeichnis

- 1: Stier CT Jr, Benter IF, Ahmad S, Zuo HL, Selig N, Roethel S, Levine S, Itskovitz HD; Hypertension 13, 115-121 (1989)
- 2: Stier CT Jr, Chander P, Gutstein WH, Levine S, Itskovitz HD; Am J Hypertens 4, 680-687 (1991)
- 3: Stier CT Jr, Adler LA, Levine S, Chander PN; J Hypertens Suppl 11, 37-42 (1993)
- 4: Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT Jr; Hypertension 31, 451-458 (1998)
- 5: Sorooshian M, Olson JL, Meyer TW; Hypertension 36, 569-574 (2000)
- 6: Epstein M; Intern. Med. 40 (7), 573-83 (2001)
- 7: Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J; N Engl J Med 341, 709-717 (1999)
- 8: Pitt B, White H, Nicolau J, Martinez F, Gheorghide M, Aschermann M, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Krum H, Mukherjee R, Vincent J; J Am Coll Cardiol 46, 425-431 (2005)
- 9: Barretto AC, Santos AC, Munhoz R, Rondon MU, Franco FG, Trombetta IC, Roveda F, de Matos LN, Braga AM, Middlekauff HR, Negro CE; Int J Cardiol (Epub) (2008)
- 10: Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T; Circ Res 93, 896-906 (2003)
- 11: Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM; Am J Surg 107, 159-75 (1964)
- 12: Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT; J Mol Cell Cardiol 26, 809-820 (1994)
- 13: Brilla CG; Herz 25, 299-306 (2000)
- 14: Staessen J, Lijnen P, Fagard R, Verschueren LJ, Amery A; J Endocrinol 91, 457-465 (1981)
- 15: Sica DA; Heart Fail Rev 10, 23-29 (2005)
- 16: Zannad F, Radauceanu A; Heart Fail Rev 10, 71-78 (2005)
- 17: Muller FU, Neumann J, Schmitz W; Mol. Cell. Biochem. 212, 11-17 (2000)
- 18: Kamp, TJ, Hell JW; Circ. Res. 87, 1095-1102 (2000)
- 19: Sulakhe PV, Vo XT; Mol. Cell. Biochem. 149-150, 103-126 (1995)
- 20: Simmerman HK, Jones LR; Physiol. Rev. 78, 921-947 (1998)
- 21: Rapacciuolo A, Suvarna S, Barki-Harrington L, Luttrell LM, Cong M, Lefkowitz RJ, Rockman HA; J Biol Chem. 278(37):35403-11 (2003)
- 22: Lohse MJ; Trends Cardiovasc Med. 5: 63-68 (1995)
- 23: Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ; Nature 415: 206-212 (2002)
- 24: Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Cohen DJ, Bianchi C, Homcy CJ, Vatner SF, Vatner DE; J Clin Invest. 91: 907-914 (1993)
- 25: Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, Lohse MJ; J Am Coll Cardiol. 27: 146-154 (1996)
- 26: Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Doring V, Kalmar P; Lancet. 2: 936-937 (1988)
- 27: Bohm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E; Circulation 82: 1249-1265 (1990)
- 28: Katz AM; Cardioscience. 4: 199-203 (1993)
- 29: Spindler M, Engelhardt S, Niebler R, Wagner H, Hein L, Lohse MJ, Neubauer S; J Mol Cell Cardiol. 35: 389-397 (2003)
- 30: Sigmund M, Jakob H, Becker H, Hanrath P, Schumacher C, Eschenhagen T, Schmitz W, Scholz H, Steinfath M; Eur J Clin Pharmacol. 51: 127-132 (1996)
- 31: Gilbert EM, Olsen SL, Renlund DG, Bristow MR; Am J Cardiol. 71: 23C-29C (1993)
- 32: Kubo H, Margulies KB, Piacentino V 3rd, Gaughan JP, Houser SR; Circulation. 104: 1012-1018 (2001)
- 33: Lowes BD, Gilbert EM, Abraham WT, Minobe WA, Larrabee P, Ferguson D, Wolfel EE, Lindenfeld J, Tsvetkova T, Robertson AD, Quaipe RA, Bristow MR; N Engl J Med. 346: 1357-1365 (2002)

- 34: Heilbrunn SM, Shah P, Bristow MR, Valantine HA, Ginsburg R, Fowler MB; *Circulation*. 79: 483–490 (1989)
- 35: Wellstein A, Belz GG, Palm D; *J Pharmacol Exp Ther*. 246: 328–337 (1988)
- 36: Metra M, Nodari S, D'Aloia A, Muneretto C, Robertson AD, Bristow MR, Dei Cas L; *J Am Coll Cardiol*. 40: 1248–1258 (2002)
- 37: Ahmad M, Medford RM; *Steroids* 60, 147-152 (1995)
- 38: Haseroth K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Gunther A, Herbst C, Christ M, Wehling M; *Biochem Biophys Res Commun* 266, 257-261 (1999)
- 39: Christ M, Günther A, Heck M, Schmidt BMW, Falkenstein E, Wehling M; *Circulation* 99, 1485-1491 (1999)
- 40: Klar J, Vitzthum H, Kurtz A; *Am J Physiol Ren Physiol* 286, F349-355 (2004)
- 41: Christ M, Wehling M, Kirsch E, Viengchareun S, Zennaro MC, Lombes M; *Mol Cell Endocrinol* 231, 23-31 (2005)
- 42: Massaad C, Houard N, Lombes M, Barouki R; *Mol Endocrinol* 13, 57-65 (1999)
- 43: Sheader EA, Wargent ET, Ashton N, Balment RJ; *Journal Endocrin* 175, 343-347 (2002)
- 44: Gonzalez-Nunez D, Morales-Ruiz M, Leivas A, Hebert SC, Poch E; *Amer Jour Physiol Ren Physiol* 286 F936-F944 (2004)
- 45: Shein HM, Enders JF; *Proc Natl Acad Sci USA* 48, 1164-1172 (1962)
- 46: Grossmann C, Benesic A, Gekle M; *Mol Endocrinol*. 19(7), 1697-710 (2005)
- 47: Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC; *Anal Biochem* 150, 76-85 (1985)
- 48: Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC; *Science* 263, 802-805 (1994)
- 49: Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S; *Steroids* 67, 499-504 (2002)
- 50: Swaney JS, Roth DM, Olson ER, Naugle JE, Meszaros JG, Insel, PA; *Proc Nat Acad Science* 102, 437-442 (2005)
- 51: Levin, ER; *Mol Endocrinol* 17, 309-317 (2003)
- 52: Grossmann C, Gekle M; *Mol Cell Endocrinol*. 277(1-2):6-12 (2007)
- 53: Micevych PE, Mermelstein PG; *Mol Neurobiol*. 38(1):66-77 (2008)
- 54: Modi DN, Shah C, Puri CP; *Soc Reprod Fertil Suppl*. 63:515-29 (2007)
- 55: Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ; *Front Neuroendocrinol*. 29(2):169-81 (2008)
- 56: Rahman F, Christian HC; *Trends Endocrinol Metab*. 18(10):371-8 (2007)
- 57: Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F; *Mol Cell Endocrinol*. 275(1-2):71-8 (2007)
- 58: Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R; *Endocrinology*. 147(12):5549-56 (2006)
- 59: Stahn C, Buttgereit F; *Nat Clin Pract Rheumatol* (2008)
- 60: Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER; *Trends Neurosci*. 31(1):1-7 (2008)
- 61: Liu X, Ostrom RS, Insel PA; *Amer Journal Phys Cell Phys* 286, C1089-C1099 (2004)
- 62: Chen YM, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS; *Journal Mol Cell Cardiology* 31, 773-783 (1999)
- 63: Thai HM, Do BQ, Tran TD, Gaballa MA, Goldman, S; *Journal of Cardiac Failure* 12, 240-245 (2006)
- 64: Hanoune J, Defer N; *Ann Rev Pharma Toxi* 41, 145-174 (2001)

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin I – Converting – Enzyme
ACL	Adenylatzyklase
Aldo	Aldosteron
AT	Angiotensin
BCA	Bicinchoninic Acid
CamK	Calmodulin-dependant Kinase
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CHF	Congestive heart failure (Herzinsuffizienz)
CHX	Cycloheximid
CRE	cAMP responsive element
CREB	CRE binding protein
CSA	CRE-SEAP-Aktivität
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EPHESUS	Eplerenone post acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study
ER	Estrogen Receptor
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
FSK	Forskolin
GDP	Guanosindiphosphat
GRE	Glucocorticoid / cAMP responsive element
GSA	GRE-SEAP-Aktivität
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	Human embryonic kidney – 293 – Zellen
hGRE	Humaner Glukokortikoidrezeptor
hMR	Humaner Mineralokortikoid – Rezeptor
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
LVAf	Linksventrikuläre Auswurfsfraktion
pDNA	Plasmid – DNA
PK A/B/C	Proteinkinase A/B/C
PTX	Pertussistoxin
RAAS	Renin – Angiotensin – System
RALES	Random Aldactone Evaluation Study
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SHRSP	spontaneous hypertensive rats stroke prone
SNS	sympathisches Nervensystem
VSMC	vascular smooth muscle cells
α -AR	α -Adrenorezeptor
β -AR	β -Adrenorezeptor

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Prof. Dr. Michael Gekle, der mich souverän und geduldig durch die Doktorarbeit begleitet hat.

Des weiteren möchte ich mich herzlich bei Ruth Freudinger und Sigrid Mildemberger bedanken, die für mich sämtliche cAMP- und Kollagen-Elisas durchgeführt und mich bei der Arbeit mit ihrer praktischen Erfahrung unterstützt haben. Auch gilt mein Dank Dr. Dr. Claudia Großmann, die stets hilfsbereit war und mir mit zahlreichen Ratschlägen weiter geholfen hat.

Vielen Dank richten möchte ich auch an Prof. Dr. M. Lohse für die adrenergen Betarezeptor-Plasmide, als auch an Prof. Dr. N. Farman für die EGFP-C1-hMR-Plasmide.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name	Martin Wuttke
Geburtsdatum	14.11.1981
Geburtsort	Münster
Adresse	Gerberstr. 3, 97070 Würzburg
Telefon	+049 931 23 00 634
Email	martin@wuttke.eu

SCHULISCHER WERDEGANG UND STUDIUM

1992 - 2001	Ratsgymnasium Bielefeld, Abitur
4/2002 - 7/2002	Auslandsaufenthalt Kanada und USA
10/2002 - 6/2009	Medizinstudium, Julius-Maximilians-Universität Würzburg 9/2005 - 7/2006: Promotion zum Thema „Die Kommunikation zwischen Aldosteron, dem humanen Mineralokortikoidrezeptor und der cAMP/CRE – Signalkaskade“ am physiologischen Institut Würzburg

PRAKTISCHE TÄTIGKEITEN

7/2001 - 4/2002	Rettungssanitäter-Ausbildung und Zivildienst, JUH Bielefeld
8/2002 - 9/2002	Krankenpflegepraktikum, Krankenhaus Halle / Westf.
9/2002 - 10/2002	Rettungsdienst, ASB-DRK-JUH Bielefeld (ehrenamtlich)
8/2003 - 10/2003	Altenpflege, DRK Altenzentrum Casteller Platz, Würzburg
10/2004 - 8/2005	Studentische Hilfskraft, physiologisches Institut Würzburg

FAMULATUREN

3/2005	Unfallchirurgie, Juliusspital Würzburg
9/2006	Innere Medizin, Universitätsspital Basel
10/2006	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Praxis Dres. med. Bockmeyer / Rühl
3/2007	Pathologie, Pathologisches Institut Würzburg
8/2007	Neurochirurgie, Universitätsklinik Würzburg
9/2007	Kinderheilkunde, Universitätsklinik Würzburg

PRAKTISCHES JAHR

2/2008 - 4/2008	Innere Medizin, Strong Memorial Hospital, Rochester NY
4/2008 - 6/2008	Innere Medizin, Therapieambulanz Universitätsklinik Würzburg
6/2008 - 10/2008	Chirurgie, Universitätsklinik Würzburg
10/2008 - 1/2009	