

INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE

Universität Würzburg

Kommissarische Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

**Aldosteron-vermittelte oxidative Nierenschädigung –
Einfluss der antioxidativen Abwehr**

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

vorgelegt von
Samuel Link
aus Heidelberg

Würzburg 2018

Referenten:

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Nicole Schupp

Korreferent: Prof. Dr. med. Stefanie Hahner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2019

Der Promovend ist Arzt.

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Inzidenz für maligne Entartungen in hypertensiven Patienten.....	1
1.2	Klassischer (genomischer) Aldosteronsignalweg	3
1.3	Nicht-genomischer Aldosteronsignalweg	4
1.4	Kardiovaskuläre und renale Schädigung durch Aldosteron.....	6
1.5	Oxidativer Stress	7
1.5.1	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies.....	8
1.5.2	NADPH-Oxidasen (Nox)	9
1.5.3	NO-Synthasen (NOS).....	12
1.6	Die antioxidative Abwehr.....	12
1.6.1	Der Transkriptionsfaktor Nrf2.....	13
1.6.2	Glutathion- und Thioredoxin-Redoxsystem.....	14
1.6.3	Häm/HO-1-System	16
1.7	Der Transkriptionsfaktor NF- κ B.....	17
2	Zielsetzung der Arbeit	18
3	Materialien und Methoden	20
3.1	Materialien.....	20
3.1.1	Versuchstiere.....	20
3.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3	Antikörper	20
3.1.4	Osmotische Pumpen	20
3.1.5	Blutdruckmessgerät	21
3.2	Methoden	21
3.2.1	Tierversuch.....	21

3.2.2	Immunhistochemie.....	23
3.2.2.1	ABC-DAB Methode	23
3.2.2.2	Quantifizierung	24
3.2.3	Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (DHE-Färbung)	25
3.2.4	Histopathologie des Nierengewebes	26
3.2.4.1	Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI)	26
3.2.4.2	Vaskulärer Schädigungsindex (VSI).....	27
3.2.4.3	Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI)	28
3.2.5	Proteinchemie: Westernblot.....	29
3.2.6	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Blutdruckentwicklung.....	33
4.2	Histopathologische Veränderungen der Niere.....	34
4.2.1	GSI/MSI	35
4.2.2	VSI.....	37
4.2.3	TSI	38
4.3	Aldosteron führt zur Bildung von ROS.....	40
4.4	Die Aktivierung von Nrf2 durch Aldosteron und durch Sulforaphan	41
4.5	Beeinflussung der Expression antioxidativer Proteine.....	42
4.5.1	Superoxiddismutase (SOD1)	43
4.5.2	Auswirkungen auf das Glutathion- und Thioredoxinsystem	43
4.5.3	Auswirkung auf die Expression von HO-1	45
4.6	Aldosteron-vermittelte Genomschädigung (γ -H2AX).....	45
5	Diskussion.....	48
5.1	Aldosteron führt MR-abhängig zu histopathologischen Schäden in der Niere mit Schwerpunkt auf Glomeruli und Gefäßwand.....	48

5.2	Aldosteron führt zur Bildung von ROS.....	52
5.3	Antioxidative Abwehr.....	54
5.3.1	Aldosteron führt zur Aktivierung von Nrf2	55
5.3.2	Auswirkung auf die Synthese antioxidativer Enzyme.....	57
5.3.3	Genomschädigende Wirkung von Aldosteron trotz Aktivierung von Nrf2 – Effektiver Schutz durch Sulforaphan	59
6	Zusammenfassung	63
7	Abkürzungsverzeichnis	65
8	Literaturverzeichnis.....	68
	Danksagung	79
	Eidesstattliche Erklärung.....	80
	Lebenslauf.....	81

1 Einleitung

1.1 Inzidenz für maligne Entartungen in hypertensiven Patienten

Nach Erhebungen der Weltgesundheitsorganisation leidet jeder fünfte Erwachsene weltweit an überhöhtem Blutdruck [1]. Arterielle Hypertonie gilt als wichtigster Einzelfaktor für die weltweite Krankheitslast und wird jährlich für 9,4 Millionen Tote verantwortlich gemacht [2]. Bluthochdruck führt primär zu Herzkreislauferkrankungen, Nierenschäden, Herzinfarkten und Schlaganfällen. 1975 wurde von Dyer et al. ein Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und einer gesteigerten Krebsmortalität postuliert [3]. In zahlreichen epidemiologischen Studien konnte in der Folge ein gesteigertes Krebsrisiko in hypertensiven Patienten gezeigt werden [4-6]. In einer Metaanalyse mehrerer Longitudinal- und Fall-Kontroll-Studien zeigte sich dabei der stärkste Effekt auf die Inzidenz von Nierenzellkarzinomen [7]. Bluthochdruck führte zu einer Verdoppelung der Nierenkrebshäufigkeit [7-9]. Bei besonders lange bestehendem Hypertonus kam es zu einer Vervierfachung des Risikos [9].

Der genaue Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und der Entstehung von Krebs ist noch nicht verstanden. Es wurden verschiedene Mechanismen diskutiert. Teilweise wird überlegt, ob der Hypertonus eine Folge der Tumorerkrankung ist [10], zumal Lee [11] zeigen konnte, dass sich die Blutdruckwerte nach der Entfernung bestimmter Tumore normalisierten. Allerdings handelte es sich dabei um *case-reports* von 3 Fällen mit Reninproduzierenden Nierentumoren, bei welchen es nach erfolgter Tumorentfernung zur Normalisierung der Renin-Plasmaspiegel und des Hypertonus kam. Beobachtungen, welche zeigen, dass mit Dauer der Hypertonieerkrankung das Krebsrisiko stieg [9], sprechen für einen pathogenen Effekt der Hypertonie auf die Tumorentwicklung und damit für eine entgegengesetzte Kausalkette. Auch fand sich bei Hypertonikern eine gesteigerte Inzidenz für Tumore außerhalb des kardiovaskulären Regelkreislaufs, wie z.B. kolorektale Tumore [12], maligne Melanome [13], oder Endometriumkarzinome [6, 14], welche primär keinen Einfluss auf eine Hypertonieentwicklung haben und gegen die These sprechen,

dass die Hypertonie als Folge der beobachteten Malignome auftritt. Die Rolle antihypertensiver Medikamente für die Tumorentstehung wird kontrovers diskutiert. In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen antihypertensiver Therapie und der Entstehung von Nierenzellkarzinomen besteht [15]. Insbesondere Diuretika wurden als Bindeglied zwischen Hypertonie und erhöhtem Krebsrisiko angeführt [16]. Der Effekt konnte aber bei unterschiedlichen Antihypertonika gezeigt werden, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Medikamenten bestand [17]. In anderen Studien wiederum konnte für keine Substanzklasse ein erhöhtes Krebsrisiko gezeigt werden [18, 19], bzw. zeigte sich ein gesteigertes Risiko nur bei gleichzeitig vorliegendem Hypertonus, [19, 20]. Im Gegensatz dazu fand sich in Patienten mit besonders schlecht eingestelltem Hypertonus die größte Risikosteigerung für Nierenzellkarzinome [9]. Des Weiteren zeigten Hypertoniker, welche noch nie eine medikamentöse Therapie bekommen haben, auch ein erhöhtes Risiko für Nierenzellkarzinome [19]. Die Ursache für erhöhte Krebsraten in Patienten mit Bluthochdruck scheint daher nicht in der antihypertensiven Therapie, sondern vielmehr in der Hypertonie selbst oder in dem miteingebundenen hormonellen Regelkreis zu liegen.

Es konnte beobachtet werden, dass es im Rahmen einer Hypertonie zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Zellwachstum und kontrolliertem Zelltod (Apoptose) kommt [21]. Auf biochemischer Ebene finden sich hohe Level von Inositoltriphosphat (IP3) und intrazellulärem Calcium, sowohl in der Pathogenese der Hypertonie, als auch bei frühen Stadien der Malignitätsentwicklung [22]. Calcium- und IP3-Level können durch Onkogene und Mitogene beeinflusst werden, Hypertrophie und Zellteilung anregen und zur Onkogenese führen. Hormone, welche im Rahmen von arterieller Hypertonie eine wichtige Rolle spielen, wie z.B. Angiotensin II, Katecholamine, Vasopressin, Insulin, Mineral- und Glukokortikoide, haben häufig einen mitogenen Effekt [22]. Es gibt zunehmende Hinweise, dass dem eng mit der Hypertonieentwicklung verknüpften Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine entscheidende Rolle in diesem Zusammenhang zukommt [23]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression bestimmter Gene des RAAS und eine gesteigerte

Natriumaufnahme mit einem erhöhten Risiko für Nierenzellkarzinome einhergeht [24]. Für Aldosteron konnte auch gezeigt werden, dass es durch die Aktivierung von Onkogenen Einfluss auf das Tumorstadium nimmt [25].

Weitere mögliche Mitverursacher der gesteigerten Krebsinzidenz könnten Risikofaktoren, welche eng mit arterieller Hypertonie verknüpft sind, wie z.B. hohes Alter, Rauchen, Alkoholkonsum und Übergewicht, sein [7]. Doch auch bei dem Vergleich von Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus mit einer nach Komorbiditäten wie z.B. Alter, Hypertonus, Gewicht und Nikotinabusus gematchten Kontrollgruppe, ließ sich ein gesteigertes Vorkommen von Malignomen in Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus nachweisen, wobei dies insbesondere das Vorkommen von Nierenzellkarzinomen betraf [26]. Aldosteron scheint daher ein eigenständiger Effekt auf die Malignomentstehung zuzukommen.

1.2 Klassischer (genomischer) Aldosteronsignalweg

Aldosteron wurde erstmals 1953 von Simpson et al. beschrieben [27]. Es handelt sich um ein Steroidhormon welches in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde gebildet wird und überwiegend mineralokortikoide Eigenschaften besitzt. Teilweise konnte auch in anderem Gewebe die Produktion von Aldosteron nachgewiesen werden, mit bislang ungeklärter lokaler Funktion [28]. Die Ausschüttung von Aldosteron wird durch Adrenocorticotropin (ACTH), Angiotensin II und Elektrolytverschiebungen (Natriummangel oder Kaliumüberschuss) angeregt. Aldosteron ist neben Angiotensin II der Hauptaktivator im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Seine Funktion ist die Kontrolle des extrazellulären Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts. Aldosteron sorgt für eine Natrium- bzw. Wasserresorption und eine Kaliumexkretion. Vermittelt werden diese Abläufe über den Mineralokortikoidrezeptor (MR). Der MR fungiert als Transkriptionsfaktor. Im inaktiven Zustand liegt er gebunden an einen Proteinkomplex im Zytosol vor [29]. Nach Bindung von Aldosteron transloziert er in den Zellkern, bindet an die DNA in der Promotorregion bestimmter Gene und veranlasst deren Transkription [30]. In den Epithelzellen der distalen Tubuli und Sammelrohre führt Aldosteron zur Expression eines epithelialen Natriumkanals (ENaC), welcher für die Aufnahme von Natrium aus

dem Lumen sorgt, sowie eines kaliumselektiven Ionenkanals (ROMK), durch welchen Kalium in das Lumen sezerniert wird, und einer Na^+/K^+ -ATPase, welche auf basaler Seite der Zelle für eine aktive Aufnahme von Na^+ in das Interstitium bzw. in die Kapillare sorgt. Dieser sogenannte genomische Signalweg führt über Transkription und Translation zur Steigerung der Zielproteine und ist dadurch mit einer Verzögerung von mindestens 30 min [31] bzw. für die vollständige Synthese aller Untereinheiten des ENaC von 6 h verbunden [32] (Vergleiche Abb. 1).

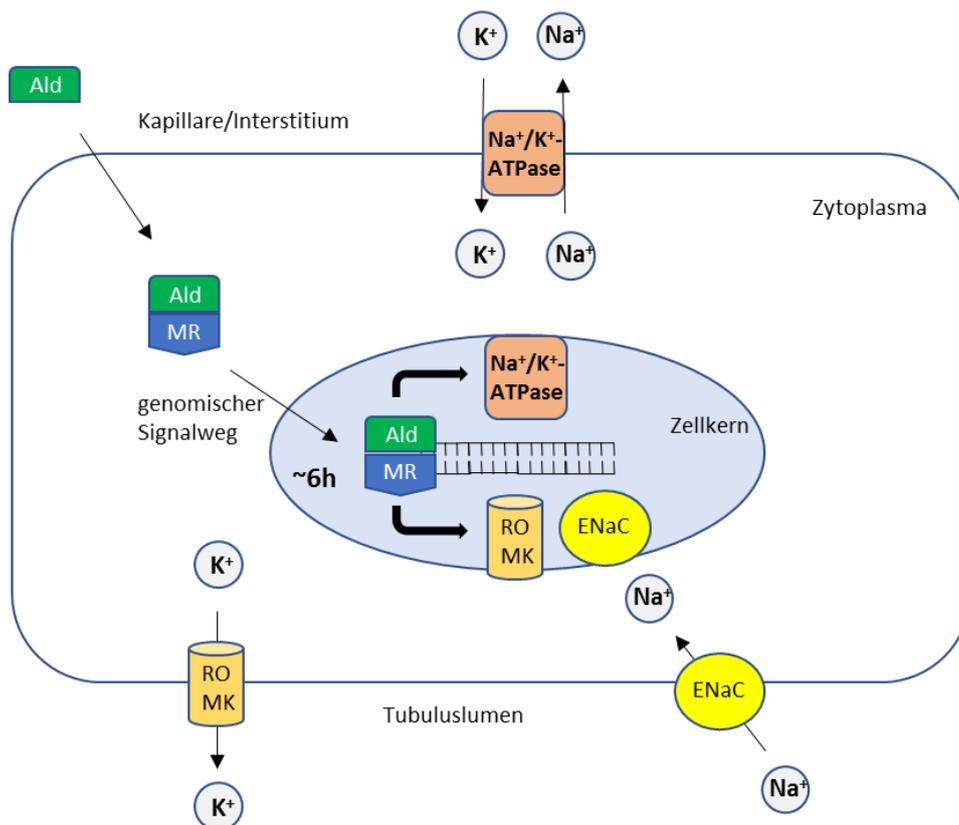


Abb. 1: Klassischer genomischer Aldosteronsignalweg.

Nach Aufnahme in die Zelle bindet Aldosteron (Ald) an den Mineralocorticoidrezeptor (MR). Dieser Komplex transloziert in den Zellkern, bindet in der Promotorregion bestimmter Gene und veranlasst deren Transkription. Das führt zur Synthese des epithelialen Natriumkanals (ENaC), des kaliumselektiven Ionenkanals ROMK und der Na^+/K^+ -ATPase. Es kommt zur vermehrten Na^+ -Resorption aus dem Lumen in den Körperkreislauf und zur gesteigerten Kaliumausscheidung. Die Effekte des genomischen Signalwegs treten mit zeitlicher Latenz von ca. 6h auf. Nach Queisser und Schupp [33].

1.3 Nicht-genomischer Aldosteronsignalweg

Neben den genomischen-Effekten können auch Aldosteronwirkungen beobachtet werden, welche bereits nach wenigen Sekunden bis Minuten

eintreten [34]. Diese sind von einer Inhibition der Transkription oder Translation unabhängig und zählen damit zu nicht-genomischen Wirkungen [35]. Schnelle nicht-genomische Signalwege finden sich bei vielen Steroidhormonen. Sie sind oft noch nicht genau verstanden und Gegenstand aktueller Forschung [36, 37]. Im Falle von Aldosteron können durch eine Inhibition des MR die nicht-genomischen Effekte teilweise verhindert werden, so dass diese, zumindest partiell, durch den MR vermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass es trotz einer Blockade des MR mit Spironolacton nach Aldosteronbehandlung zu einem raschen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg kommt [38]. Teilweise wird wegen des Fortbestehens bestimmter nicht-genomischer Aldosteroneffekte ein dritter, MR-unabhängiger, Aldosteronsignalweg angenommen [35]. Auch eine Formationsänderung des MR, durch welche er noch Aldosteron, aber kein Spironolacton mehr bindet, wird vermutet [36]. Unabhängig von dieser Diskussion kommt es im Rahmen der Vermittlung nicht-genomischer Effekte zu einer Aktivierung von Botenstoffen (second Messenger) [33]. Zu beobachten ist dabei unter anderem ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} , eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), eine Freisetzung von IP3 und Diacylglycerin (DAG), eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) oder ein Anstieg von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) [39-41]. Des Weiteren werden z.B. die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) ERK 1/2, die Tyrosinkinase c-Src oder der Wachstumshormonrezeptor EGFR aktiviert [38, 42]. Zwischen den genomischen und nicht-genomischen Signalwegen von Aldosteron wird gegenseitige Beeinflussung vermutet z.B. durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [35, 43] (Vergleiche Abb. 2). Die genauen Regelkreisläufe und Wechselwirkungen sind jedoch noch nicht aufgeklärt.

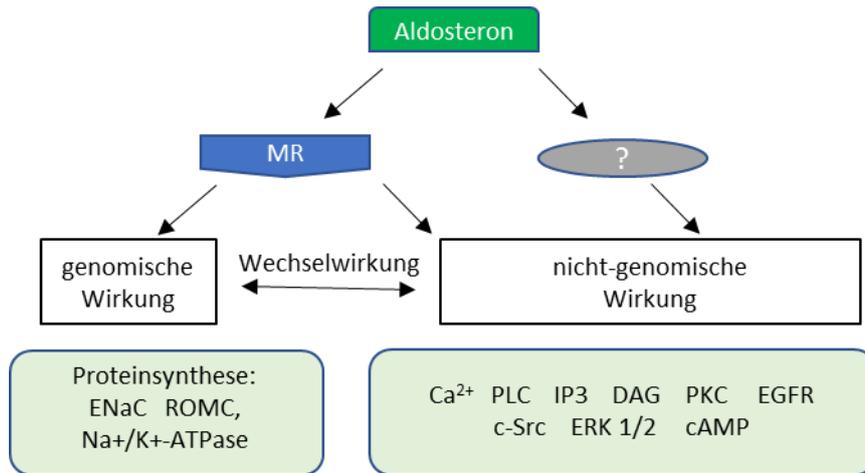


Abb. 2: Erweiterter Aldosteronsignalweg.

Neben dem genomischen Signalweg führt Aldosteron auch zu nicht-genomischen Wirkungen wie z.B. einem Anstieg des intrazellulären Calciums, einer Aktivierung von PLC, IP3, DAG, PKC, EGFR, c-Src, ERK 1/2 oder cAMP. Unter anderem kann dies zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Synthese bestimmter Enzyme führen, was wieder eine genomische Wirkung darstellen würden, so dass eine gewisse Wechselwirkung zwischen diesen Signalwegen besteht. Der genaue Mechanismus der nicht-genomischen Aldosteronwirkungen ist noch Gegenstand aktueller Forschung [36]. Teilweise wird dabei ein weiterer, MR-unabhängiger Signalweg diskutiert [35]. Modifiziert nach Grossmann und Gekle [35].

1.4 Kardiovaskuläre und renale Schädigung durch Aldosteron

Erhöhte Aldosteronlevel finden sich deutlich häufiger im Serum hypertensiver Patienten, als bislang angenommen [44, 45]. Bei randomisierten Kontrolluntersuchungen zeigten bis zu 32,4 % der untersuchten hypertonen Patienten erhöhte Aldosteronspiegel im Plasma [46]. Auch in Patienten mit Herzinsuffizienz fanden sich deutlich höhere Aldosteronlevel als bei gesunden Altersgenossen [47]. In der Studie RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) konnte gezeigt werden, dass Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz erheblich von einer Anti-Aldosterontherapie mit Spironolacton profitieren. Neben einer Therapie mit Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmern (ACEi), Schleifendiuretikum und Digoxin erhielten die Patienten Spironolacton. Dadurch konnte die Mortalität um 30% gesenkt werden [48]. In der Studie EPHEBUS (*Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) zeigte sich bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion nach akutem Myokardinfarkt durch Zugabe von Eplerenon eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität oder Hospitalisierung um 13 % [49]. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Aldosteron zu Fibrose in Niere, Herz und

Gefäßwänden führt, wobei die Endorganschäden durch eine Blockade des MR vermeidbar waren [50]. In Patienten korrelieren hohe Aldosteronlevel negativ mit der renalen Filtrationsrate [51]. Eine Blockade des Aldosteronsignalweges mittels MR-Inhibitoren führte in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, unabhängig von einer Senkung des Blutdrucks, zu einer Verbesserung der Proteinurie [52, 53]. In den genannten Studien und Publikationen wurde die Anti-Aldosterontherapie in der Regel additiv zu einem bereits etablierten Therapiekonzept gegeben. Die protektiven Effekte traten auf, obwohl Blutdruck und Volumenstatus bereits durch z.B. ACEi oder Diuretika kontrolliert waren. Die Effekte können folglich nicht durch eine Hemmung von klassischen Aldosteronwirkungen (Natrium- und Volumenretention) erklärt werden, vielmehr muss die Antwort im erweiterten Aldosteronsignalweg liegen. Neben der Synthese von Aldosteron in der *Zona glomerulosa* der Nebennierenrinde konnte gezeigt werden, dass dieses auch lokal, z.B. im Herzen, in Gefäßwänden und der Niere, produziert wird [54] und beispielsweise in herzinsuffizienten Patienten zu Myokardfibrosen führen kann [55]. Fortschreitende Organfibrose kann auch Ausgangspunkt maligner Entartungen sein [56]. Patienten mit erhöhten Aldosteronleveln und Herzinsuffizienz zeigten erhöhte Plasmamarker für oxidativen Stress [57]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Aldosteron insbesondere in Gefäßwänden, im Herzen und den Nieren zur Entstehung von oxidativem Stress führt [33]. Diesem gesteigerten oxidativen Stress scheint eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Aldosteron-vermittelten Organschäden zuzukommen. [33, 58].

1.5 Oxidativer Stress

Schon vor über 60 Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen freien Radikalen und einem schädigenden Einfluss auf den Organismus proklamiert [59]. In der Folge konnte 1968 nachgewiesen werden, dass freie Radikale in Form von Superoxiden auch im normalen Zellablauf als Nebenprodukt bestimmter Regelungskreisläufe anfallen [60]. Im Folgejahr wurde die Superoxiddismutase (SOD) und deren protektive Funktion – die Umsetzung anfallender Superoxide – beschrieben [61]. Seitdem wurden die molekularbiologischen Vorgänge der

Entstehung, des Abbaus und des Einflusses freier Radikale immer weiter erforscht und entschlüsselt. Es dauerte nicht lange, bis ein Zusammenhang zwischen freien Radikalen und organischen Pathologien gezeigt werden konnte [62, 63] und der Einfluss freier Radikale in das Zentrum medizinischer Forschung rückte. Besonders bei der Karzinomentstehung wird ein Zusammenhang mit ROS beschrieben. Dies wird sowohl in deren schädigendem Einfluss auf das Erbgut als auch durch epigenetische Veränderungen, wie z.B. durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, gesehen [64, 65]. Doch wird auch zunehmend bei anderen Krankheitsbildern ein Zusammenhang mit erhöhten ROS-Leveln oder erhöhter Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress gesehen. Beispielhaft seien hier Herzinsuffizienz [66], Diabetes mellitus [67], Niereninsuffizienz [68], Parkinson [69], aber auch psychiatrische Krankheiten wie Depression [70] und Schizophrenie [71] genannt.

1.5.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies

Die weitaus größte Gruppe freier Radikale im menschlichen und tierischen Organismus ist die Gruppe der Sauerstoffradikale. Diese gehören zu den reaktiven Sauerstoffspezies. Sie entstehen kontinuierlich zum einen endogen als Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels oder durch Enzymaktivitäten, aber auch exogene Einflüsse wie ionisierende Strahlen, Zigarettenrauch, Medikamente oder Ozon führen zur Bildung von ROS [72]. ROS kommen in der Zelle eigene biochemische Funktionen zu. Sie spielen beispielsweise eine wichtige Rolle in Zellkommunikation, Regulierung von Wachstum, Apoptose und Entzündungsgeschehen [73], aber sie sind auch auf systemischer Ebene an der Regelung komplexer Prozesse, wie z.B. der Blutdruckregulierung, dem Immunsystem und kognitiven Prozessen beteiligt [74]. Für den Unterschied zwischen nützlicher oder schädlicher Wirkung von ROS ist ein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und antioxidativen Mechanismen entscheidend. Kommt es z.B. durch vermehrtes Anfallen von ROS zu einem Ungleichgewicht dieser Homöostase wird das als oxidativer Stress bezeichnet. Es kommt zu DNA- und RNA-Schäden, Oxidation von Fettsäuren und Aminosäuren, wodurch Lipide, Proteine und Enzyme in ihrer Struktur verändert

und in ihrer Funktion gestört werden [75]. Funktionieren die Kontrollmechanismen der Zelle bzw. des Zellverbandes, kommt es, sofern die Schäden nicht behoben werden können, zur Apoptose der Zelle. Es kann aber auch zum Fortbestehen und zur Entartung der Zelle kommen, was einen möglichen Startpunkt der Tumorentstehung darstellen könnte.

Die Gruppe der ROS lässt sich unterteilen in freie Radikale wie z.B. Superoxid (O_2^-), Peroxinitrit ($ONOO^-$), Hydroxylradikale (OH^\cdot) und nicht-Radikale wie Ozon (O_3), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder hypochlorige Säure ($HClO$) [75]. Allen gemein ist ihre starke chemische Reaktionsfreudigkeit durch ungepaarte Valenzelektroden oder instabile Bindungen [74]. Sie sind in der Lage, sowohl durch Abgabe als auch Aufnahme eines Elektrons eine Oxidation bzw. Reduktion ihres Reaktionspartners durchzuführen [72]. In aller Regel beginnt die Bildung von ROS mit der Elektronenübertragung auf Sauerstoff und der Bildung von O_2^- . O_2^- ist kurzlebig und reagiert schnell weiter. Superoxid kann mit Stickstoffmonoxid (NO), welches durch die NO-Synthase gebildet wird [76], zum sehr reaktiven Peroxinitrit ($ONOO^-$) reagieren. Peroxinitrit ist ein starkes Oxidans, welches sowohl über Apoptose als auch Nekrose den Zelltod einleiten kann [77]. Des Weiteren werden Superoxide durch die Superoxiddismutase (SOD) (oder auch spontan) in H_2O_2 umgewandelt. H_2O_2 ist weniger reaktiv, dafür langlebiger und in der Lage Membranen zu überqueren. Aus H_2O_2 können wiederum hypochlorige Säure ($HClO$), Singulett-Sauerstoff (1O_2) oder das Hydroxylradikal (OH^\cdot) entstehen (Vergleiche Abb. 6). Der größte Anteil der Superoxide wird durch Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen gebildet [78].

1.5.2 NADPH-Oxidasen (Nox)

Die NADPH-Oxidasen (Nox) sind membranständige Multi-Enzymkomplexe, deren Funktion der Transfer von Elektronen über biologische Membranen ist, wobei die Elektronenübertragung auf Sauerstoff erfolgt und das Endprodukt Superoxid oder Wasserstoffperoxid ist. Nox-Enzyme finden sich ubiquitär im menschlichen Organismus [79]. Die Familie der Nox besteht aus mehreren Isoformen, welche gewebespezifisch gebildet werden. Nox2, mit seiner

Untereinheit gp91phox, gilt dabei als erstbeschriebenes und am besten verstandenes Mitglied der Nox-Familie. Es wurde im Zusammenhang mit dem „oxidative burst“ in Neutrophilen und Makrophagen beschrieben [80], ist aber in zahlreichen Gewebearten zu finden und stellt den „Prototyp“ der Nox-Enzyme dar [79]. Es besteht aus einem membrangebundenen und einem sich im Zytosol befindenden Anteil. Die Untereinheiten gp91phox (Nox2) und gp22phox sind membranständig und bilden zusammen ein heterodimeres Flavoprotein (Cytochrom b_{558}), welches den Elektronentransfer katalysiert [81]. Die Untereinheiten gp47phox, gp67phox (Aktivator) und gp40phox befinden sich im Zytosol und haben vor allem regulative Funktion. Nach Phosphorylierung von gp47phox lagern sich diese dem membrangebundenen gp22phox an. Ebenso lagert sich die GTPase Rac an die Untereinheit Nox2 an und interagiert mit ihr [82] und der Aktivatoruntereinheit gp67phox [83]. Der Enzymkomplex ist nun aktiv und beginnt Elektronen von NADPH aus dem Zytosol auf Sauerstoff jenseits der Membran zu übertragen. (Abb. 3)

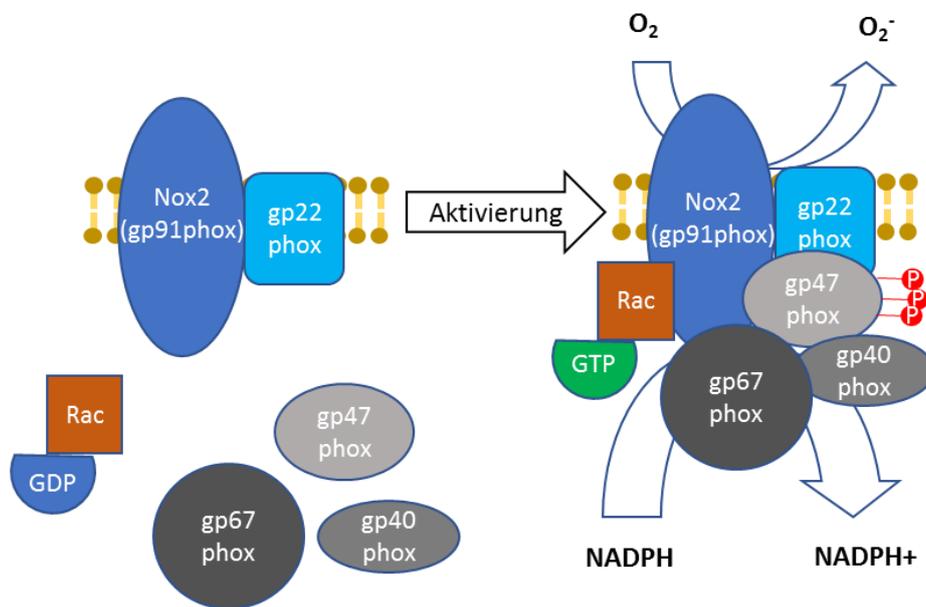


Abb. 3: Aktivierung von NADPH-Oxidase (Nox2).

Der Komplex aus Nox2 (gp91phox) und gp22phox ist membranständig und bildet ein heterodimeres Flavoenzym Cytochrom b_{558} aus. Im Ruhezustand liegen die Untereinheiten gp40phox, gp47phox und gp67phox frei im Zytosol vor. Zur Aktivierung wird gp47phox phosphoryliert. Die regulatorischen Untereinheiten binden an gp22phox. Die GTPase Rac wird durch Bindung von GTP aktiviert und bindet an den Komplex. Der Komplex ist nun aktiviert, als Elektronendonator dient NADPH. Die Elektronen werden auf der Gegenseite der Membran auf Sauerstoff übertragen. Modifiziert nach Bedard und Krause [79].

Derzeit sind 7 Nox-Formen bekannt (Nox1-5, Duox1, Duox2); alle sind Transmembranproteine, sie dienen dem Elektronentransport und ihr Hauptprodukt sind ROS. Sie bestehen in der Regel aus einer katalytischen membranständigen Einheit und aus einer oder mehreren regulatorischen Untereinheiten [84]. Nox-Homologe finden sich in nahezu jedem Gewebe, wobei Nox1 vor allem im Kolonepithel, Nox2 in Phagozyten, Herz, Neuronen und Niere, Nox3 im Innenohr, Nox4 in den Tubuluszellen der Niere, Nox5 in lymphatischem Gewebe und Duox1 und Duox2 in der Schilddrüse vorkommen [85]. Nox5, Duox1 und Duox2 haben die Besonderheit, dass sie durch die Ca^{2+} -Konzentration gesteuert werden [74]. Im renalen und kardiovaskulären Gewebe konnten Nox1, 2, 4 und 5 nachgewiesen werden [86]. Nox4 hat eine Sonderstellung. Man geht davon aus, dass Nox4 über eine Basisaktivität verfügt und nicht durch regulatorische Untereinheiten aus dem Zytosol an- oder ausgeschaltet, sondern über die Gen-Expression reguliert wird [87, 88]. Nox4 ist dabei weiterhin auf die Anwesenheit von gp22phox angewiesen. Der Einfluss von kleinen G-Proteinen (Rac) auf die Aktivität ist noch unklar [79, 88]. Eine weitere Besonderheit von Nox4 ist, dass fast ausschließlich H_2O_2 als Produkt nachgewiesen werden kann. Unklar ist, ob es das Endprodukt von Nox4 ist, oder eine sehr schnelle Umwandlung von O_2^- durch SOD erfolgt [74]. (Abb. 4)

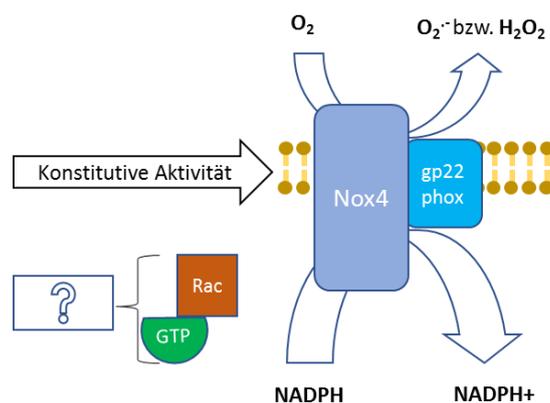


Abb. 4: Aktivität von Nox4.

Nox4 ist membranständig und verfügt über eine konstitutive Grundaktivität. Nox4 ist auf die Anwesenheit von gp22phox angewiesen, jedoch sind keine weiteren regulatorischen Untereinheiten aus dem Zytosol nötig Als Produkt wird vor allem H_2O_2 nachgewiesen, ob dies an einer raschen Umwandlung von Superoxid liegt ist unklar. Ebenso ist der Einfluss vom G-Protein Rac noch nicht geklärt. Modifiziert nach Holterman et al.[89].

Eine Aktivierung von NADPH-Oxidasen durch Aldosteron gilt als gesichert [33]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Aldosteron beispielsweise zu einer gesteigerten Expression von Nox2 und Nox4 in der Niere führt [90], die Aktivierung aber auch über Rac vermittelt werden kann [91].

1.5.3 NO-Synthasen (NOS)

Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) kommen in den meisten Eukaryonten vor und sind Enzyme, welche die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin katalysieren. Beim Menschen gibt es folgende drei Isoformen: endotheliale NOS (eNOS), induzierbare NOS (iNOS) und neuronale NOS (nNOS) [76]. Alle drei Isoformen sind in der Niere vertreten [92]. Sie unterliegen einer komplizierten Regulierung. eNOS und nNOS werden konstitutiv exprimiert und ihre Aktivität über Ca^{2+} und den Cofaktor Calmodulin reguliert [93]. Die Synthese von iNOS wird durch Umgebungsreize oder Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B induziert [94]. iNOS führt dann zur raschen Bildung großer Mengen NO [93]. NO ist ein gasförmiges, sehr kurzlebiges Radikal, welches über Zellmembranen diffundieren kann und im Körper verschiedene Aufgaben wahrnimmt, wie Signaltransduktion, Regulierung des Gefäßtonus oder unspezifische Immunabwehr [92]. In großen Mengen und in der Anwesenheit von Sauerstoffradikalen bildet NO mit Superoxid (O_2^-) das toxische und sehr reaktionsfreudige Peroxinitrit (ONOO^-). Peroxinitrit führt zur Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA, sowie, z.B. durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, zu Entzündungsreaktionen [77]. Die Verfügbarkeit von Substrat und Cofaktor stellen wichtige Regulierungsmöglichkeiten der NOS dar [95].

1.6 Die antioxidative Abwehr

Im aeroben Metabolismus sind die Zellen ständig einer potentiellen Gefahr durch anfallende freie Radikale ausgesetzt, das hat zur Entwicklung eines gut organisierten antioxidativen Schutzsystems geführt [96]. Dabei kann zwischen enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen unterschieden werden. Die wichtigsten Vertreter der nicht-enzymatischen Antioxidantien sind

Ascorbinsäure (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E), Glutathion (GSH), Thioredoxin (Trx) Carotinoide und Flavonoide [97]. Sie fungieren meist als Radikalfänger und reagieren mit den freien Radikalen, wodurch sie selbst verändert und "verbraucht" werden. Sie müssen dann nachproduziert oder durch andere Antioxidantien reaktiviert werden [97]. Zu den Hauptvertretern der enzymatischen antioxidativen Abwehr gehören die Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPx), Katalase (CAT), Glutathionreduktase (GR), Glutamatcysteinylgase (GCL), Glutathionsynthetase (GSS), NAD(P)H:quinon-Dehydrogenase-1 (NQO1), Glutathion-S-Transferase (GST), Hämoxxygenase-1 (HO-1), Thioredoxinreduktase (TrxR) und weitere Phase-II Enzyme [98, 99]. Die Expression der entsprechenden Gene wird durch den Transkriptionsfaktor Nuclear-factor-erythroid-2-related-factor-2 (Nrf2) gesteuert [99]. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 wird deshalb als zentraler Regulator der antioxidativen Abwehr angesehen [100].

1.6.1 Der Transkriptionsfaktor Nrf2

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist im Gegensatz zu seinem Namensgeber Nuclear-factor-erythroid-2 (NF-E2) [101] nicht auf hämatopoetische Zellen beschränkt, sondern wird vielmehr ubiquitär in den verschiedensten Geweben exprimiert [102]. Nrf2 gehört zur Familie der „basic leucine zipper“-Proteine (bZIP). An seinem C-Terminus findet sich eine Domäne mit basischen Aminosäuren (vorwiegend Leucin), welche bei der Bindung an die DNA und Dimerisierung mit weiteren Proteinen eine entscheidende Rolle spielt [102]. Im Ruhezustand wird Nrf2 durch eine Bindung an das Kelch-like ECH-associated Protein 1 (Keap1) inaktiviert und im Zytosol gehalten [103]. Keap1 hat dabei weitere Bindungsstellen, welche zum einen über eine Bindung an das Zytoskelett für eine Verankerung des gesamten Komplexes im Zytosol sorgen [104]. Zum anderen wird durch die Bindung eines E3 Ligase-Komplexes (Cul3-Roc1) an Keap1 für die Ubiquitinierung von Nrf2 gesorgt und damit dessen proteasomaler Abbau reguliert [105]. Es findet so ein kontinuierlicher Abbauprozess von Nrf2 statt, mit einer Halbwertszeit von weniger als 20 Minuten [105]. Bei der Anwesenheit von oxidativem Stress oder freien Radikalen kommt es zur Änderung von

Cysteinresten an Keap1, die Ubiquitinierung von Nrf2 durch Cul3 wird gehemmt, der Abbau von Nrf2 gestoppt, dieses akkumuliert und transloziert in den Zellkern [106]. Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung von Nrf2 ist über die Proteinkinase C, die Nrf2 an Serin 40 phosphorylieren kann, wodurch es auch zu einer Lösung von Nrf2 von Keap1 kommt [107]. Nach Translokation in den Zellkern bildet Nrf2 Heterodimere mit mehreren kleinen Maf-Kinasen, bindet in den regulatorischen Bereichen zahlreicher zytoprotektiver Gene (ARE – antioxidant response element) und initiiert die Synthese antioxidativer Enzyme sowie von Phase-2-Entgiftungsenzymen [108, 109] (Abb. 5)

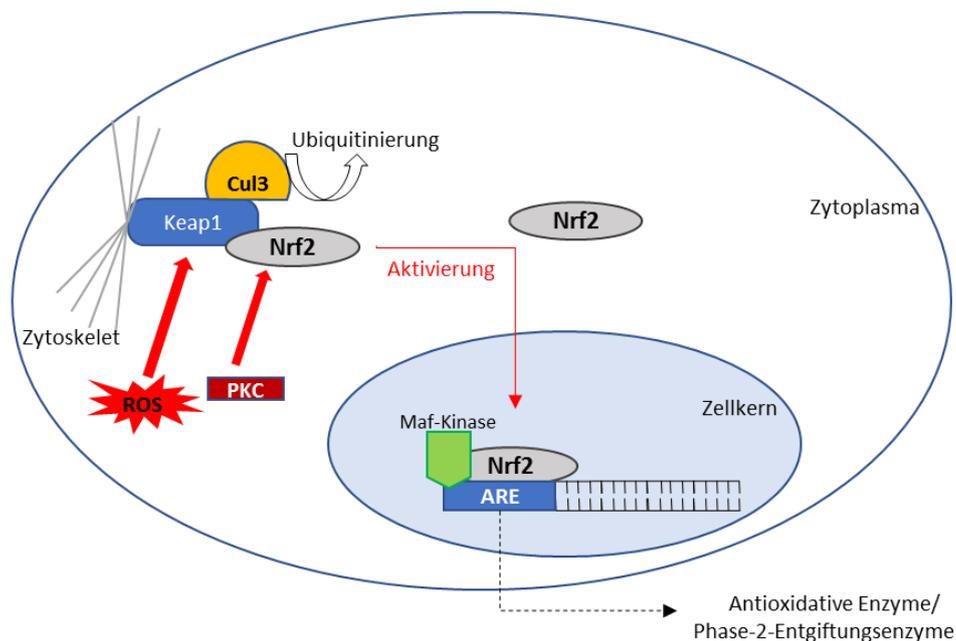


Abb. 5: Regulierung des Transkriptionsfaktor Nrf2.

Im Ruhezustand ist Nrf2 im Zytosol an Keap1 gebunden und dadurch inaktiv. Der ebenfalls an Keap1 gebundene E3-Ligase Komplex (Cul3) sorgt für Ubiquitinierung und kontinuierlichen Abbau von Nrf2. Keap1 ist dabei am Zytoskelett gebunden und verankert den Komplex im Zytosol. Durch Einwirkung von ROS oder Proteinkinase C (PKC) wird der Abbau von Nrf2 gestoppt, es kommt zur Freisetzung von Nrf2. Nrf2 akkumuliert und transloziert in den Kern, wo es mit Maf-Kinasen Heterodimere bildet, an ARE-Bereiche (Antioxidant response element) bindet und so für die Bildung zytoprotektiver Enzyme sorgt. Modifiziert nach Motohashi und Yamamoto [110].

1.6.2 Glutathion- und Thioredoxin-Redoxsystem

Das Glutathionssystem stellt eines der wichtigsten Redoxsysteme der Zelle dar [97]. GSH wird in zwei Schritten mittels Glutamacysteinligase (GCL) und Glutathionsynthetase (GSS) gebildet. Der erste Schritt ist dabei der

geschwindigkeitsbestimmende. GCL ist ein heterodimeres Protein, welches aus einer katalytischen Untereinheit (GCLC) und einer modifizierenden Untereinheit (GCLM) besteht [111]. GSH dient in Redoxvorgängen als Elektronenspender. Es wird zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert, welches durch die Glutathionreduktase (GR) unter Verwendung von NADPH wieder in seine reduzierte Form GSH umgewandelt werden kann [112]. GSH wird als Cofaktor vieler antioxidativer Enzyme benötigt, so auch bei der Umwandlung von H_2O_2 in Wasser durch die Glutathionperoxidase (GPx) (Vergleiche Abb. 6). GSH kann selbst auch als Radikalfänger fungieren oder zur Reaktivierung anderer Antioxidantien wie z.B. Vitamin C und Vitamin E genutzt werden [97]. Thioredoxin (Trx) bildet mit der Thioredoxinreduktase (TrxR) und NADPH ein weiteres wichtiges Redoxsystem, welches ähnliche Funktionen hat und insbesondere zu der Reduktion oxidierter Proteine beiträgt [113]. Die Funktion der Superoxiddismutase (SOD) ist die Umwandlung von Superoxiden zu H_2O_2 (Vergleiche Abb. 6).

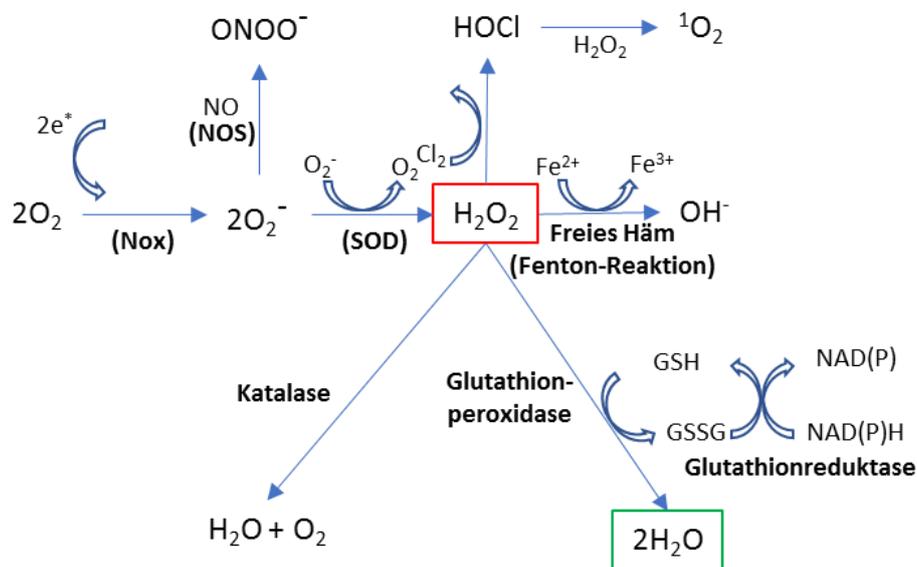


Abb. 6: Entstehung von ROS und enzymatische Umwandlung.

Superoxidradikale (O_2^-) werden hauptsächlich durch NADPH-Oxidasen (Nox) gebildet. O_2^- kann mit Stickstoffmonoxid (NO), welches durch NO-Synthasen gebildet wird, zum sehr reaktiven Peroxynitrit (ONOO^-) reagieren. Die Umwandlung von O_2^- zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erfolgt spontan oder durch die Superoxiddismutase (SOD). Aus H_2O_2 können wiederum hypochlorige Säure (HClO), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) oder über freies Häm Hydroxylradikale (OH^-) entstehen. H_2O_2 kann durch die Katalase oder die Glutathionperoxidase, unter Glutathionverbrauch, zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) umgesetzt und unschädlich gemacht werden. GSH wird dabei zu GSSG oxidiert. Durch die Glutathionreduktase wird Glutathion unter Verbrauch von NADPH wieder in seine reduzierte Form überführt. Modifiziert nach Brieger et al. [74].

1.6.3 Häm/HO-1-System

Ein weiteres wichtiges antioxidatives Enzym ist die Hämoxigenase-1 (HO-1). Die Expression von HO-1 wird ebenfalls durch Nrf2 reguliert und durch oxidativen Stress induziert. HO-1 schützt die Zelle vor den Folgen von freiem Häm und hat mehrere antioxidative Eigenschaften. Das Vorliegen von freiem Häm in der Zelle kann über die Fenton-Reaktion H_2O_2 zu OH^- wandeln (Vergleiche Abb. 6) und zur Vermittlung des zellulären Untergangs durch Apoptose beitragen [114]. HO-1 kann freies Häm zu Fe^{2+} , Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin umwandeln. Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase rasch zu Bilirubin umgewandelt. Fe^{2+} wird als Ferritin in der Zelle gespeichert. CO, Ferritin und Bilirubin sind Antioxidantien und haben einen zytoprotektiven Effekt [115]. Für HO-1 konnte auch eine Hemmung der NADPH-Oxidasen gezeigt werden, welcher vermutlich durch Bilirubin vermittelt wird [116] (Vergleiche Abb. 7).

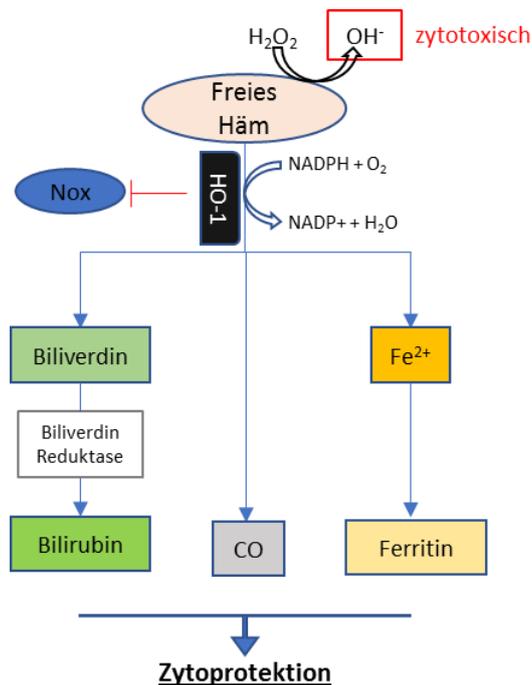


Abb. 7: Das Häm/Ho-1-System

Freies Häm in der Zelle kann über die Fenton-Reaktion H_2O_2 zu zytotoxischem OH^- wandeln. HO-1 wandelt freies Häm unter NADPH-Verbrauch zu Fe^{2+} , Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin um. Biliverdin wird über die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin umgewandelt. Das aus dem Häm gelöste Fe^{2+} wird als Ferritin gespeichert. Alle drei Endprodukte wirken zytoprotektiv. Für HO-1 konnte auch eine Hemmung der Nox gezeigt werden. Modifiziert nach Gozzelino et al. [114]

1.7 Der Transkriptionsfaktor NF-κB

Der Transkriptionsfaktor „*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*“ (NF-κB) nimmt eine Schlüsselrolle im Ablauf vieler zellulärer Prozesse, wie z.B. Entzündungsreaktionen, Proliferation und Apoptose, ein. Stimuli, welche zur Aktivierung von NF-κB führen, sind: Zytokine, ionisierende Strahlung, bakterielle Bestandteile, oxidativer Stress oder andere potentiell schädliche Einflüsse [33, 117]. Für mehr und mehr Karzinomarten können Zusammenhänge zwischen chronischen Entzündungen und der Karzinogenese gezeigt werden [118, 119]. Die Krebszellen werden dabei durch den Entzündungsprozess moduliert und übernehmen Eigenschaften von inflammatorischen Zellen, wie die Ausbildung von Rezeptoren zur Migration und Invasion bzw. eine unkontrollierte Proliferation [120]. NF-κB scheint bei der Ausbildung dieser Fähigkeiten eine entscheidende Rolle zu spielen und wird als Schlüsselprotein im Bereich der Onkogenese gesehen [121, 122]. Die Modulation der NF-κB-Aktivierung gilt als ein neuer Ansatzpunkt in der Krebstherapie [123]. Es konnte gezeigt werden, dass Aldosteron zu einer Aktivierung von NF-κB führt [33]. Der Mechanismus ist noch nicht genau verstanden. Im Nierengewebe konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Aktivierung von NF-κB durch Aldosteron über den MR verläuft, sowie von einem Anstieg von Ca^{2+} und einer gesteigerten Produktion von ROS abhängig ist [124]. Dem Transkriptionsfaktor NF-κB kommt eine wichtige Rolle in der Vermittlung von unerwünschten Aldosteronwirkungen, wie der Ausbildung von Entzündungen und Fibrose, zu und er führt zur Expression pro-oxidativer Enzyme wie Nox und NOS, wodurch oxidativer Stress weiter verstärkt wird [33].

2 Zielsetzung der Arbeit

Es gelang unserer Arbeitsgruppe in vorangegangenen Arbeiten zu zeigen, dass Aldosteron *in vitro* und *in vivo* zur Bildung von oxidativem Stress und DNA-Schädigung führt. Auch ein Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren Nrf2 und NF- κ B sowie deren Zielstrukturen konnte im Zellversuch gezeigt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an die bereits gewonnenen Erkenntnisse anknüpfend, die Aldosteron-vermittelte oxidative Nierenschädigung näher zu analysieren sowie die auf Zellebene gezeigte Beeinflussung der antioxidativen Schutzmechanismen im lebenden Organismus nachzuweisen und die beteiligten Regelkreisläufe zu beleuchten. Dazu wurde ein Interventionsversuch durchgeführt. Die Versuchstiere bekamen neben einer Behandlung mit Aldosteron gruppenabhängige Interventionen für 28 Tage mit folgenden Substanzen:

Spironolacton wirkt als kompetitiver Antagonist am Mineralkortikoidrezeptor. Das Ziel war es zu bestätigen, dass die beobachteten Wirkungen über den MR vermittelt wurden und ob eine Blockade des MR einen effektiven Schutz bietet.

Apocynin ist ein Hemmstoff der NADPH-Oxidase. Nach oraler Aufnahme muss er durch Peroxidasen aktiviert werden und verhindert dann den Aufbau des Multienzymkomplexes der NADPH-Oxidase aus den Untereinheiten [125]. Durch den Einsatz von Apocynin sollte die Bildung von oxidativem Stress verhindert werden.

L-NAME (L-Nitroargininmethylester) ist ein direkter Hemmstoff der NO-Synthasen. Durch L-NAME sollte eine gesteigerte Synthese von NO verhindert werden. NO kann mit Superoxiden zu Peroxinitrit reagieren und zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen.

PDTC (Pyrrolidindithiocarbamate) hemmt die Aktivierung und Translokation von NF- κ B.

Sulforaphan ist ein natürlich vorkommender Nrf2-Aktivator. Es kommt insbesondere in Kreuzblütengewächsen wie Kohl und Broccoli vor. Sulforaphan

führt vermutlich über eine Modulation von Keap1 zur Freisetzung und Aktivierung von Nrf2. Es werden auch Beeinflussungen anderer Transkriptionsfaktoren beobachtet, wie z.B. eine Hemmung des NF- κ B Signalweges [126]

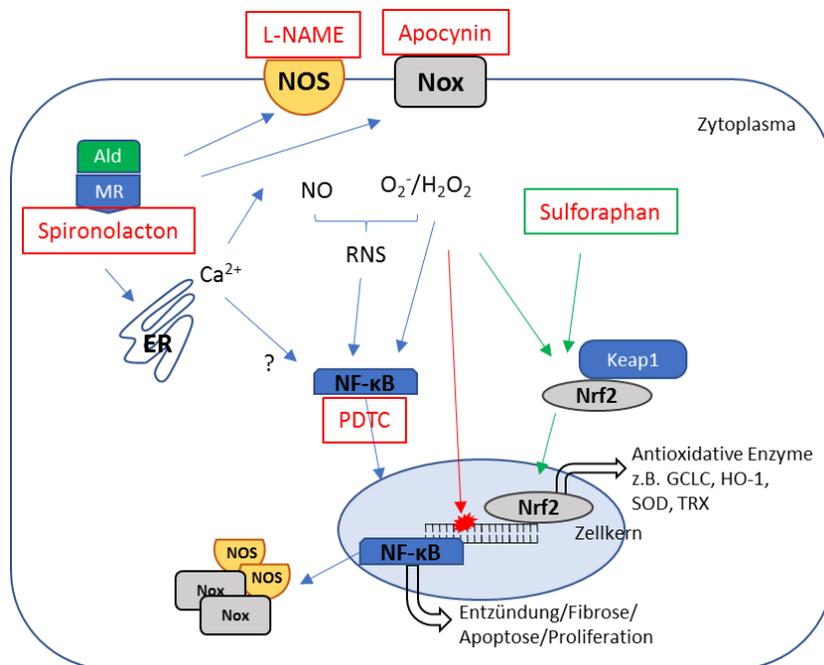


Abb. 8: Schematische Darstellung der dem Versuchsaufbau zugrundeliegenden (vermuteten) Signalwege samt Ansatzpunkten der Inhibitoren und des Aktivators.

Aldosteron führt über den MR zu einer Aktivierung von NOS und Nox, welche zumindest teilweise über die Freisetzung von intrazellulärem Calcium vermittelt wird. Es kommt zur Entstehung von oxidativen und nitrosativen Stress. Dieser führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Ebenfalls kann der Anstieg von intrazellulärem Calcium zu einer Aktivierung von NF- κ B führen, wobei der Mechanismus noch weitgehend unklar ist (vergleiche [127]). NF- κ B dissoziiert in den Zellkern und veranlasst dort die Synthese pro-oxidativer Enzyme wie NOS und Nox bzw. initiiert Entzündung, Fibrose, Apoptose und Proliferation. Der steigende oxidative Stress kann zu Genomschäden führen. Einen möglichen Schutz bietet die Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Steigende ROS-Level können zu einer Aktivierung von Nrf2 führen. Ebenfalls führt Sulforaphan zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges. Nrf2 dissoziiert in den Zellkern und veranlasst die Synthese antioxidativer Enzyme wie z.B. GCLC, HO-1, SOD und TRX. Die Wirkorte der verwendeten Inhibitoren waren wie folgt: Spironolacton wirkt als kompetitiver Antagonist am MR. L-NAME bzw. Apocynin führen zu einer Inhibition von NOS bzw. Nox und sollten so die Entstehung von oxidativen Stress verhindern. Die Intervention mit PDTC hatte zum Ziel den NF- κ B-Signalweg zu blockieren. In Anlehnung an Schupp et al. [128] und Queisser et al. [33, 129, 130].

Für den Nachweis und die Quantifizierung der Aldosteron-vermittelten Nierenschädigung wurden histopathologische Schädigungsscores bestimmt und immunhistochemisch DNA-Doppelstrangbrüche analysiert. Die Beeinflussung der antioxidativen Abwehr wurde durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 mittels immunhistochemischer Färbung und die Quantifizierung antioxidativer Enzyme mittels Proteinbiochemie analysiert.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Verwendet wurden 61 männliche Sprague Dawley Ratten (RjHan:SD) der Firma Janvier (Janvier, Le Genest-St-Isle, France).

3.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen; Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) Biomol (Hamburg, Germany), Waldeck GmbH& Co. KG (Münster, Germany) oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland). Dihydroethidium (DHE) wurde von EMD Chemicals Inc. (San Diego, CA, USA), Spironolacton, L-Nitroargininmethylester (L-NAME) und Aldosteron von Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Apocynin von Calbiochem (San Diego, CA, USA) und Sulforaphan von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany oder California, USA) bezogen.

3.1.3 Antikörper

Die Antikörper gegen Nrf2 (C-20: sc-722), γ -Glc (sc-22755), mouse-IgG-HRP (sc-2005), donkey anti-rabbit-IgG-B (sc-2089) wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA), Phospho-Histone H2A.X (Ser139, 20E3, #9718), rabbit-IgG HRP-linked, GAPDH (14C10, #2118) von Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA), HO-1 (ab13243) von abcam (Cambridge, UK), TrxR1 (N3C2, GTX108727) und SOD1 (GTX100554) von GeneTex Inc. (Irvine, California, USA) bezogen.

3.1.4 Osmotische Pumpen

Verwendung fanden implantierbare osmotische Pumpen von Alzet (Alzet, Modell 2004; Durect Corporation, Cupertino, CA, USA).

3.1.5 Blutdruckmessgerät

Die Blutdruckmessung erfolgt mittels der nicht-invasiven tail-cuff-Methode und wurde mit dem Gerät BP-2000 Blood Pressure Analysis System Series II der Firma Visitech Systems (Apex, USA) durchgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Tierversuch

61 männliche Sprague Dawley Ratten (RjHan:SD) (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) wurden im Alter von 8 Wochen zufällig auf 8 Gruppen verteilt. Jede Gruppe enthielt dabei 8 Versuchstiere, mit Ausnahme der Sulforaphan-Gruppe, dieser wurden 5 Tiere zugeteilt. Nach einer 2-wöchigen Akklimatisation und einer 2-wöchigen Phase in der die Tiere an die Blutdruckmessung gewöhnt wurden, wurden die Tiere narkotisiert (Ketamin: 90 mg/kg KG und Xylazin 6 mg/kg KG i.m. (medistar, Ascheberg, Germany)) und ihnen osmotische Minipumpen (Alzet, model 2004; Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) implantiert. Die Kontroll- und Sulforaphangruppe erhielten über die Pumpe PBS, die anderen Gruppen erhielten 0,75 µg/h * kg KG Aldosteron. Gruppe 3 erhielt zusätzlich Spironolacton (75 mg/d * kg KG) im Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany). Gruppe 4 erhielt Apocynin (50 mg/d * kg KG) und Gruppe 5 L-NAME (25 mg/d * kg KG) zusätzlich im Trinkwasser. Gruppe 6 wurde Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC, 100 mg/d * kg KG) dem Futter beigemischt. Gruppe 7 und Gruppe 8 erhielten im Trinkwasser noch Sulforaphan (15 mg/d * kg KG) (Siehe *Tabelle 1*). Der Blutdruck wurde wöchentlich mittels nichtinvasiver tail-cuff-Methode (Gerät BP-2000 Series II, Visitech Systems, Apex, USA) gemessen [131]. Nach 28 Tagen wurden die Tiere in tiefe Narkose versetzt (Ketamin: 120 mg/kg KG und Xylazin 8 mg/kg KG i.m. (medistar, Ascheberg, Germany)), in Rückenlage fixiert, Bauchraum und Thorax eröffnet, das Gefäßsystem punktiert und zunächst Deltadex 40 (10 % Dextran 40, 0,9 % NaCl (AlleMan Pharma GmbH, Rimbach, Deutschland) + 1 % Procainhydrochlorid (Steigerwald, Darmstadt, Germany)) infundiert. Dextran und Procain dienen dabei zur Weitstellung der Gefäße und Hemmung der Thrombozytenaggregation. Im Anschluss wurden die Organe mit eiskalter 0,9%iger Natriumchloridlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) perfundiert und entnommen. Zur histologischen Aufarbeitung

wurden Organanteile entwässert und in Paraffin gebettet. Für die Anfertigung von Gefrierschnitten und proteinchemischen Verfahren erfolgte das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -80°C.

Der Tierversuch wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft zur Handhabung von Versuchstieren und dem deutschen Tierschutzgesetz von Dr. Nina Queisser und Thomas Büdel (technische Assistenz) durchgeführt. Der Tierversuch wurde durch die Regierung Unterfranken (Würzburg) genehmigt (Nummer 55.2-2531.01-75/12).

Tabelle 1 Übersicht über den Tierversuch

Durchgeführt von Dr. Nina Queisser und Thomas Büdel (technische Assistenz).

Gruppe	Anzahl	Osmotische Pumpe		Zusatz
1 Kontrolle	8	PBS	1% NaCl im Trinkwasser	
2 Ald	8	0,75 µg/h * kg KG Aldosteron		
3 Spiro	8	0,75 µg/h * kg KG Aldosteron		Spironolacton (75 mg/d * kg KG) im Futter
4 Apo	8	0,75 µg/h * kg KG Aldosteron		Apocynin (50mg/d * kg KG) im Trinkwasser
5 L-NAME	8	0,75 µg/h * kg KG Aldosteron		L-NAME (25 mg/d * kg KG) im Trinkwasser
6 PDTC	8	0,75 µg/h * kg KG Aldosteron		PDTC (100 mg/d * kg KG) im Futter
7 Sulf+Ald	8	0,75 µg/h * kg KG Aldosteron		Sulforaphan (15 mg/d * kg KG) im Trinkwasser
8 Sulf	5	PBS		Sulforaphan (15 mg/d * kg KG) im Trinkwasser

3.2.2 Immunhistochemie

3.2.2.1 ABC-DAB Methode

Die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Methode dient dazu bestimmte Antigene bzw. Epitope in einem histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Dabei bindet ein primärer Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen. Ein sekundärer Antikörper, welcher mit Biotin gekoppelt ist, bindet an den Primärantikörper. Durch Zugabe eines Komplexes von Avidin, Biotin und biotinkonjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) wird das Biotin des Sekundärantikörpers und damit mittelbar das nachzuweisende Antigen mit dem Enzym HRP verknüpft. Mit Hilfe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) kann dieser Komplex nun farblich sichtbar gemacht werden.

Die zu untersuchenden 2 µm starken Paraffinschnitte wurden bei 60 °C für 1 h erwärmt, dann erfolgte die Entparaffinierung in folgenden Schritten: 3 x 4 Minuten in Roti-Histol, 3 x 2 Minuten in 100% EtOH, 1 x 2 Minuten in 70% EtOH. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Durch die Fixierung mittels Formalin und die Einbettung in Paraffin können Quervernetzungen und Denaturierungen der Antigene entstehen. Diese wären dann nicht mehr durch den Primärantikörper detektierbar. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in Citratpuffer (10 mM, pH 6) für 15 Minuten bei 95°C erhitzt. Und zum Abkühlen für weitere 30 Minuten im Citratpuffer belassen, gefolgt von einer Waschung mit PBS. Die weiteren Schritte erfolgten, wenn nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur in einer dunklen feuchten Kammer. Durch elektrostatische oder ähnliche Wechselwirkungen kann es zu unspezifischen Bindungen des primären Antikörpers z.B. mit stark geladenen Proteinen oder Bindegewebeelementen kommen. Um Ladungsträger zu neutralisieren und ungewollte Bindungen zu verhindern wurden die Schnitte für 1 h in Blockierlösung (5% Esel-Serum in PBS) blockiert. Hiernach erfolgte Waschung mit PBS. Um die Umsetzung des Chromogens durch endogene Peroxidasen zu verhindern wurden die Schnitte für 15 Minuten mit 3% H₂O₂ inkubiert. Nach Waschung mit PBS, folgte die Inkubation für 15 Minuten mit 0,001% Avidin und 0,001% Biotin um im Gewebe vorhandenes Avidin abzusättigen. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen, der Primärantikörper (Nrf2 (sc-722) (Santa Cruz, California,

USA) bzw. Phospho-Histone H2A.X (Ser139, 20E3, #9718) (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)), verdünnt in Blockierlösung (1:200), aufgetragen und die Schnitte bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in PBS gewaschen, der mit Biotin gekoppelte Sekundärantikörper (donkey anti-rabbit-IgG-B (sc-2089) (Santa Cruz, California, USA)) aufgetragen (Verdünnung 1:200 in PBS) und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschung mit PBS wurden die Schnitte mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Reagenz (Vectastain Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories, CA, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss und nach erneuter Waschung in PBS wurde das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) (Vector Laboratories, CA, USA) aufgetragen. Dieses wird durch die in der ABC-Reagenz enthaltenen Meerrettichperoxidase (HRP) zu einem braunen Farbstoff umgewandelt. Nach einer Inkubation von 2 Minuten wurde das DAB-Reagenz mit Leitungswasser abgewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Hämatoxyllin für 2 Minuten gefärbt und unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gewaschen. Es folgte die Entwässerung der Schnitte (1 Minute 70% EtOH, 4 x 2 Minuten 100% EtOH, 1 Minute Roti-Histol, 2 x 3 Minuten Roti-Histol) und das Eindecken mittels Eukitt. Bilder der Färbung wurden am Lichtmikroskop Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit integrierter Kamera Leica ICC50 HD bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen. (Siehe Abb. 9).

3.2.2.2 Quantifizierung

Pro Tier wurden von Kortex und Mark jeweils 8 Bilder ausgewertet. Die Auswertung der Bilder erfolgte zum einen durch Auszählung der DAB-positiven Kerne und zum anderen wurde die Gesamtzahl der Kerne eines Bildes mit Hilfe des Programms Cellprofiler 2.0 (www.cellprofiler.org) [132] bestimmt. Die positiv gefärbten Kerne wurden dann in Relation zur Gesamtanzahl der Kerne gesetzt.

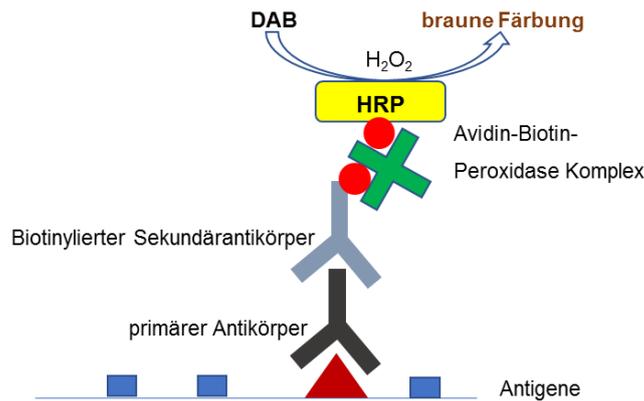


Abb. 9: ABC-DAB Methode zum immunhistochemischen Nachweis bestimmter Antigene.

Das nachzuweisende Antigen wird durch den Primärantikörper markiert. Der biotinylierte sekundäre Antikörper ist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörper gerichtet und bindet diesen. Am Biotin des Sekundärantikörper bindet Avidin welches weitere Bindungsstellen für Biotin besitzt. An diese bindet Biotin welches wiederum an die Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden ist. HRP setzt unter Anwesenheit von H₂O₂ DAB zu einem braunen Farbstoff um.

3.2.3 Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies (DHE-Färbung)

Aufgrund ihrer Instabilität und Reaktionsfreudigkeit, ist der direkte Nachweis Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nicht möglich. Um das Vorhandensein von ROS im Gewebe zu messen, wurde Dihydroethidium (DHE) verwendet. DHE ist ein zellpermeabler Fluoreszenzfarbstoff, welcher in Anwesenheit von ROS oxidiert und in Ethidium umgewandelt wird, welches in die DNA interkaliert und einen Farbumschlag von blau nach rot erfährt.

Für die Färbung wurden am Gefriermikrotom Leica CM 3050 S 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und diese bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur einige Sekunden antauen gelassen und dann mit 10 µM DHE-Lösung behandelt und für 20 Minuten in einer dunklen Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden dann am Mikroskop Nikon Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Germany) bei 200-facher Vergrößerung unter Verwendung des Tritc-Filters mit der Kamera Intas MP5000 (Intas, Göttingen, Germany) aufgenommen. Die Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte durch Analyse der Grauwerte mit dem Programm CellProfiler 2.0 (www.cellprofiler.org) [132]. Zur Auswertung wurden mindestens 7 Bilder pro Tier herangezogen.

3.2.4 Histopathologie des Nierengewebes

Die entnommenen Nieren wurden per Lichtmikroskop auf das Vorhandensein histopathologischer Veränderungen untersucht. Dazu wurden 2 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-, Perjodessigsäure-Schiff (PAS)- und Siriusrot-Färbung angefärbt. Im Anschluss wurden folgende 4 Schädigungsindizes bestimmt: Glomeruloskleroseindex (GSI), Mesangiolyseindex (MSI), vaskulärer Schädigungsindex (VSI) und tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI).

3.2.4.1 Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI)

Die Veränderung der Glomeruli und des mesangialen Gewebes wurde mit den Scoringssystemen: Glomeruloskleroseindex (GSI) und Mesangiolyseindex (MSI) erfasst. Dem Mesangium kommt eine Stützfunktion für die glomeruläre Struktur und den innerhalb des Glomerulus verlaufenden Kapillaren zu. Im Rahmen von Nierenpathologien, kann es sowohl zur übermäßigen Zunahme, als auch zur Degeneration von mesangialem Gewebe kommen. Der Glomeruloskleroseindex (GSI) ist ein morphologisches Scoringssystem zur quantitativen Bestimmung der glomerulären Schädigung. Dabei wird die Proliferation und Ausdehnung der Mesangiumzellen bestimmt. Der Mesangiolyseindex (MSI) erfasst die Veränderung der Kapillaren, welche bei Verlust von mesangialem Stützgewebe dilatieren. Da beide Veränderungen in der Regel zeitgleich auftreten und in einander übergehen können wurden die Scores parallel erfasst. Dazu wurden Gewebeschnitte mit der PAS-Methode gefärbt und am Lichtmikroskop Leica DM750 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung mäanderförmig abgefahren. Die Glomeruli wurden analog der Methode von el Nahas [133] beurteilt (*Tabelle 2*).

Tabelle 2 Stadien glomerulärer Schädigung nach el Nahas [133]

Stadium	Histologische Veränderung		Anteil
	GSI	MSI	
0	Normales Glomerulus	Keine Veränderung der Kapillaren	0%
1	Mesangiale Verdickung mit und ohne Proliferation von Mesangiumzellen, keine Kapillarbeteiligung	Erweiterung einzelner Kapillaren	<25%
2	Mesangiale Proliferation mit partieller Gefäßwandbeteiligung, segmentale Sklerose	Erweiterung von Kapillaren >25% Oder Kapillaraneurysma bis 50%	25-50%
3	Große Teile der Kapillaren mit Obliteration oder Narbenformation, diffuse Sklerose	Kapillaraneurysma	50-75%
4	Totale Obliteration der Kapillaren mit und ohne Kapillarthrombose, globale Sklerose mit Kapillarkollaps	Kapillaraneurysma	>75%

Insgesamt wurden pro Tier 45 Glomeruli erfasst. Der GSI/MSI wurde dann anhand nachfolgender Formel berechnet.

$$GSI/MSI = \frac{(nS0) + (nS1) + (nS2) + (nS3) + (nS4)}{45}$$

n = Anzahl der Glomeruli in dem Entsprechenden Stadium

S = Stadium 0 - 4

3.2.4.2 Vaskulärer Schädigungsindex (VSI)

Der vaskuläre Schädigungsindex (VSI) wurde genutzt um die Veränderung der intrarenalen Gefäße zu beschreiben und zu klassifizieren. Dazu wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte am Lichtmikroskop Leica DM750 bei

200facher Vergrößerung betrachtet. Der Nierenrindenbereich wurde mäanderförmig abgefahren und 20 Gefäße pro Tier beurteilt und anhand der Stadien nach Veniant et al [134] eingeteilt (Tabelle 3). Der VSI wurde dann mit nachfolgender Formel berechnet.

$$VSI = \frac{(nS0) + (nS1) + (nS2) + (nS3) + (nS4)}{20}$$

n = Anzahl der Glomeruli in dem Entsprechenden Stadium

S = Stadium 0 - 4

Tabelle 3 Stadien vaskulärer Schädigung nach Veniant [134]

Stadium	Histologische Veränderung	Gefäßwandverdickung
0	Normale Gefäße	0%
1	Geringe Gefäßwandverdickung	<25%
2	Moderate Gefäßwandverdickung	25-50%
3	Schwere Gefäßwandverdickung	>50%
4	Fibrinoide Nekrose der Gefäße	

3.2.4.3 Tubulointerstitieller Schädigungsindex (TSI)

Der tubulointerstitielle Schädigungsindex (TSI) ermöglicht die Beurteilung des Tubulussystems und des Interstitiums der Niere. Es handelt sich dabei um einen kombinierten Score, welcher sich aus Bewertungen von Fibrose, interstitieller Entzündung, tubulärer Atrophie und Dilatation zusammensetzt. Die Beurteilung der Fibrose wurde mittels Siriusrot-Färbung durchgeführt. Für Entzündungen wurde nach Leukozytenansammlungen in HE-Färbung gesucht. Mittels PAS-Färbung wurde die Atrophie der Basalmembran und eine Dilatation der Tubuli beurteilt. Bewertet wurden jeweils 30 Gesichtsfelder pro Tier und Färbung. Die Schnitte wurden dabei am Lichtmikroskop Leica DM750 bei 200facher Vergrößerung betrachtet und mäanderförmig im Rindenbereich abgefahren. Die Beurteilung erfolgte in Anlehnung an die Kriterien nach Veniant et al [134]. Der TSI wurde dann gemäß folgender Formel berechnet:

$$TSI = \frac{Atrophie((nS0)+(nS1)+(nS2)+(nS3)) + Fibrose((nS0)+(nS1)+(nS2)+(nS3)) + Entzündung((nS0)+(nS1)+(nS2)+(nS3)) + Dilatation((nS0)+(nS1)+(nS2)+(nS3))}{120}$$

n = Anzahl der Glomeruli in dem Entsprechenden Stadium

S = Stadium 0 - 3

Tabelle 4 Stadien tubulointerstitieller Schädigung nach Veniant[134]

Stadium	Histologische Veränderung	Anteil am Gesichtsfeld
0	Normales Tubulussystem	0%
1	Zeichen einer interstitiellen Entzündung und Fibrose, tubulärer Atrophie	<25%
2	Zeichen einer interstitiellen Entzündung und Fibrose, tubulärer Atrophie und Dilatation	25-50%
3	Zeichen einer interstitiellen Entzündung und Fibrose, tubulärer Atrophie und Dilatation	>50%

3.2.5 Proteinchemie: Westernblot

Mit der Westernblot-Methode können spezielle Proteine eines Proteingemisches nachgewiesen und Aussagen über deren Menge getroffen werden. Dazu werden die Proteine mittels Gel-Elektrophorese entlang ihrer Molekülmasse in einer Trägermatrix (z.B. SDS-Page) aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt der Proteintransfer (Blotting) durch ein orthogonal zum Gel gerichtetes elektrisches Feld auf eine Trägermembran (i.d.R. Polyvinylidendifluorid (PVDF) oder Nitrocellulose). Das nachzuweisende Antigen wird dann durch Inkubation mit dem speziell dagegen gerichteten Antikörper (= Primärantikörper) markiert. Ein zweiter Antikörper (= Sekundärantikörper), welcher mit einem Enzym verknüpft ist (z.B. HRP), bindet das Fc-Fragment des Primärantikörpers und ist durch Zugabe eines Reagenzes (z.B. Luminol) detektierbar.

Für die Herstellung des Proteinextraktes wurden ca. 40 mg von in flüssigem Stickstoff gefrorenem Nierengewebe gemörsert und mit einem Mikropistill pulverisiert. Anschließend wurden 500 µl RIPA-Puffer (50 mM Tris, 150mM NaCl,

1mM EDTA, 0,025% Natriumdesoxycholat, 1% Nonidet, 1 mM NaF), welchem pro ml noch 5 µg eines Protease-Inhibitor-Cocktails und 10 µg eines Phosphataseinhibitors (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) zugefügt wurden, hinzugegeben und das Gemisch zehnmal durch eine 1 ml Spritze mit einer 26 G Kanüle gezogen. Im Anschluss wurde es bei 4°C und 8000g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Proteingehalt wurde dann mit der Bradford-Methode [135] bestimmt. 50 µg des Proteingemisches wurden mit 5µl Roti-Load (8% SDS, 20% 2-Mercaptoethanol, 40 Glycerin, 0,015% Bromphenolblau (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany)) versetzt, bei 95°C für 5 min aufgekocht und im Anschluss direkt auf Eis gelagert. Durch die Zufuhr von Hitze und SDS kommt es zum Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen und zum Verlust der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine. Durch Anlagerung von SDS werden vorhandene Eigenladungen der Proteine überdeckt, was zu einer konstanten negativen Ladung der Proteine beiträgt. Das Thiol Mercaptoethanol führt durch Reduktion zur Spaltung von Disulfidbrücken (z.B. zwischen Cysteinresten) und damit zum weiterem Aufbrechen der Proteinstrukturen. Die so vorbereiteten Proteingemische wurden dann mittels SDS-PAGE-Verfahren anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt. Dazu wurden sie auf ein 12,5%iges Polyacrylamidgel geladen, in eine Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3 mM SDS) gegeben und ein elektrisches Feld angelegt. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C, zunächst mit 30-minütiger Einlaufphase bei 100 V und im Anschluss für 1 h bei 200 V. Es folgte die Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel in Richtung Anode. Die Migrationsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Molekülgröße, so dass die kleinsten Proteine, am Ende der Elektrophorese, den weitesten Weg zurückgelegt haben und sich am nächsten zur Anode wiederfinden. Um diesen Prozess zu visualisieren und eine spätere Größenordnung der Proteine zu ermöglichen, liefen farbige Molekulargewichts-Marker mit (Page Ruler, Thermo Scientific, Rockford, USA). Im Anschluss wurden die Proteine im Nass-Blott Verfahren auf eine PVDF-Trägermembran (Roti-PVDF, 0,45 µm, Roth, Karlsruhe, Deutschland) übertragen. Die Membran wurde zunächst für 1 Minute

in Methanol inkubiert und anschließend, dem Gel aufliegend, in eine Elektrophoresekammer gegeben. Die Kammer wurde mit Transferpuffer gefüllt (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% MeOH) und ein orthogonal zu Gel und Membran verlaufendes elektrisches Feld angelegt (100 V, 60 Minuten, 4°C). Hierdurch erfolgte die Migration der Proteine in Richtung Membran, an welcher sie durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen haften bleiben. Um einen erfolgreichen Proteintransfer nachzuweisen, wurde die Membran mit Ponceau S (Ponceau S 250 mg, H₂O 45 ml, MeOH 40 ml, Essigsäure 15 ml) angefärbt und im Anschluss mit Entfärberlösung (H₂O 82,5 ml, MeOH 7,5 ml, Essigsäure 10 ml) wieder entfärbt und mit PBS gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren wurden die Membranen für mindestens 2 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung (5 % Milchpulver oder 5 % BSA in TBS-T (50mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20)) inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper, im Blockiermedium entsprechend verdünnt und aufgetragen **γ-GCSc** (sc-22755), (Santa Cruz, California, USA); **GAPDH** (14C10, #2118) 1:4000 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA); **HO-1** (ab13243) 1:1000 (abcam, Cambridge, UK); **TrxR1** (N3C2, GTX108727) 1:1000, **SOD1** (GTX100554) 1:1000 (GeneTex Inc., California, USA)) und über Nacht bei 4°C einwirken gelassen. Am nächsten Tag wurden die Membranen in TBS-T 3-mal für 10 Minuten gewaschen und der entsprechende Sekundärantikörper aufgetragen (anti-rabbit IgG HRP-linked 1:1000 – 1:7000 (in Blockierlösung), #7074, (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte erneutes Waschen in TBS-T (3 x 10 min) und Inkubation der Membran mit Luminol (Supersignal West Dura, Thermo Scientific, Rockford, USA) für 5 min in einer lichtgeschützten Kammer. In Gegenwart von H₂O₂ wird Luminol durch die Meerrettichperoxidase in seine oxidierte Form überführt und deren Lumineszenz wurde mittels Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) erfasst. Die Auswertung und Quantifizierung der Banden erfolgte mit dem Programm ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) [136].

3.2.6 Statistik

Die Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Pro Gruppe wurde der Mittelwert von 5-8 Tieren gebildet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS 21 (IBM, Somers, USA) bzw. Prism 7 (GraphPad, La Jolla, USA) verwendet. Mittels Shapiro-Wilk-Test wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Werte wurden mit einer Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Vergleich nach Scheffé oder Turkey getestet. Daten ohne Normalverteilung wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend post-hoc Test nach Dunn analysiert. Dabei wurde sowohl gegen die Kontrolle als auch gegen die Aldosteron-Gruppe getestet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant anerkannt. Für die Auswertung der DHE-Färbung wurde ein ungepaarter t-Test zwischen den Gruppen und der Kontrolle durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Blutdruckentwicklung

Zur Beurteilung des Blutdrucks, wurde in wöchentlichen Abständen der Blutdruck mittels nichtinvasiver tail-cuff-Methode gemessen [131]. Die Messungen wurden bereits 2 Wochen vor Versuchsbeginn durchgeführt, um so die Tiere an die Messmethode zu gewöhnen und bestehende Gruppenunterschiede aufzudecken. Die Tiere zeigten in dieser Phase keine signifikanten Unterschiede. Während der Versuchszeit zeigte die Kontrolle einen geringen, doch kontinuierlichen Blutdruckanstieg, vermutlich durch die Zugabe von 1 % NaCl im Trinkwasser, welche alle Gruppen betraf. Die Aldosterongruppe zeigte ab der 2. Versuchswoche (Woche 4) bis zum Ende des Versuchs einen signifikanten Anstieg des Blutdrucks im Vergleich zur Kontrolle. Die Interventionen mit Spironolacton und PDTC konnten diesen Anstieg weitgehend verhindern und führten letztlich zu signifikant niedrigeren Blutdruckwerten im Vergleich zur Aldosterongruppe. Auch die Interventionen mit Apocynin und Sulforaphan zeigten einen ähnlich niedrigen Blutdruckanstieg und im Vergleich zur Aldosterongruppe deutlich niedrigere Blutdruckwerte, konnten allerdings keine Signifikanz erreichen. Die Behandlung mit L-NAME führte sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zur Aldosterongruppe zu einer signifikanten Zunahme des Blutdrucks. Damit zeigte diese Gruppe die höchsten Blutdruckwerte im Versuch. Die alleinige Gabe von Sulforaphan zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Änderung des Blutdrucks.

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Blutdruckwerte.

Der Blutdruck wurde wöchentlich mittels nicht-invasiver tail-cuff-Methode gemessen [131]. Nach 2-wöchiger Gewöhnungsphase an die Messmethode begann der Versuch wie unter 3.2.1 beschrieben. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler der gemessenen Blutdruckwerte. Statistisch signifikante Abweichungen sind grau unterlegt. *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle; ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ald. Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, Sulf: Sulforaphan. Durchgeführt von Thomas Büdel (technische Assistenz).

Gruppe	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6
Kontrolle	139 \pm 3,5	139 \pm 2,4	140 \pm 2,8	142 \pm 2,4	147 \pm 4,2	153 \pm 5,2
Aldosteron	149 \pm 3,7	144 \pm 3,5	146 \pm 4,2	166 \pm 5,9*	180 \pm 6,1*	180 \pm 7,3*
Spiro./Ald.	141 \pm 3,1	141 \pm 2,4	138 \pm 4,5	152 \pm 3,4	150 \pm 2,0°	152 \pm 2,8°
Apo./Ald.	145 \pm 4,2	140 \pm 3,2	137 \pm 7,1	148 \pm 7,2	159 \pm 5,2	155 \pm 6,4

Ergebnisse

LN/Ald.	147 ± 1,3	145 ± 2,8	150 ± 9,5	174 ± 5,2**	189 ± 8,8**	209 ± 12***/°
PDTC/Ald.	145 ± 3,2	141 ± 2,8	144 ± 4,0	155 ± 3,8	162 ± 3,9	154 ± 3,6°
Sulf./Ald.	144 ± 3,4	130 ± 4,6	135 ± 2,8	154 ± 4,9	161 ± 4,6	161 ± 3,1
Sulf.	136 ± 3,2	139 ± 4,9	135 ± 4,2	151 ± 3,4	139 ± 4,6	147 ± 3,4

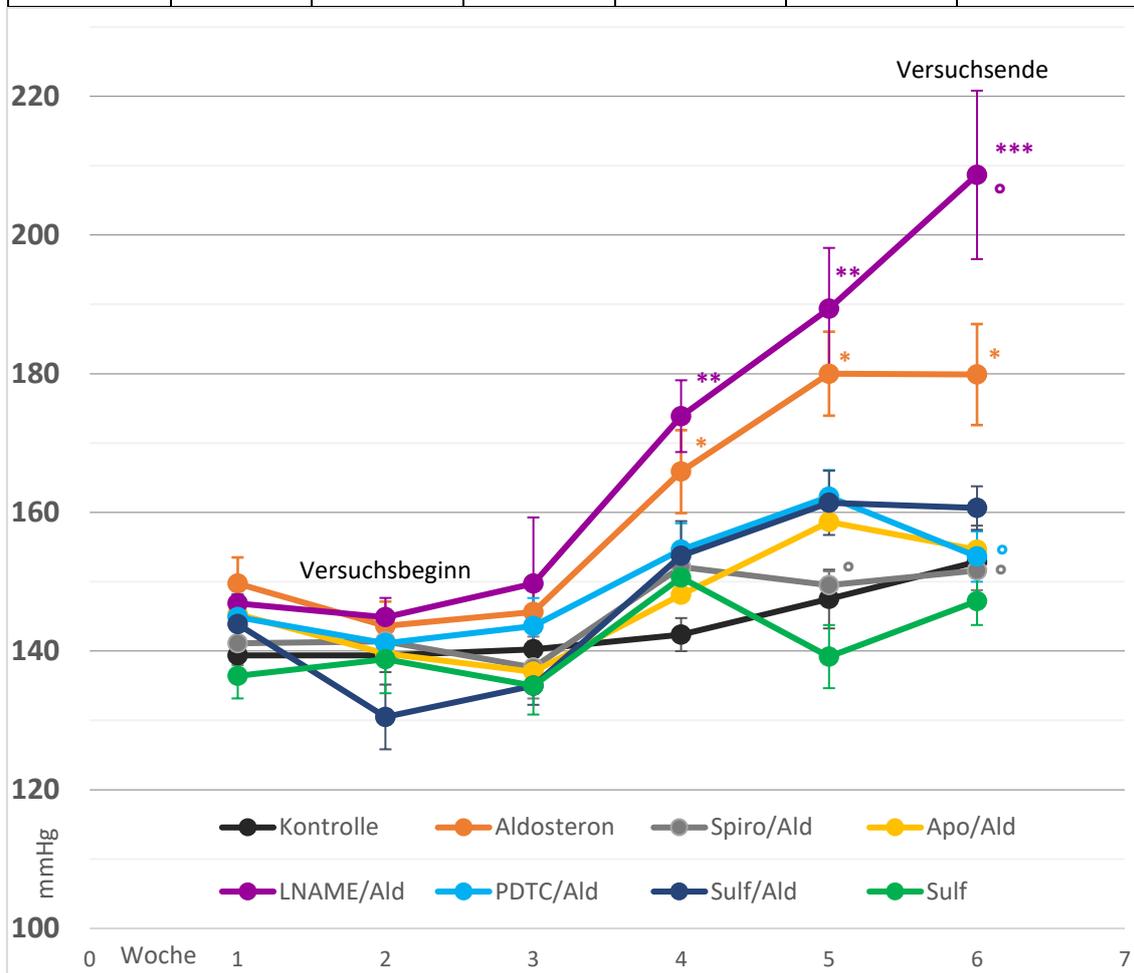


Abb. 10: Graphische Darstellung der Blutdruckwerte.

Der Blutdruck wurde wöchentlich mittels nicht-invasiver tail-cuff-Methode gemessen [131]. Nach 2-wöchiger Gewöhnung an die Messmethode begann der Versuch wie unter 3.2.1 beschrieben für einen Zeitraum von 28 Tagen. Gezeigt ist eine graphische Darstellung der Mittelwerte ± Standardfehler der gemessenen Blutdruckwerte. *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle; ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ald. Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, Sulf: Sulforaphan.

4.2 Histopathologische Veränderungen der Niere

Zur Beurteilung histopathologischer Veränderungen an den Nieren der Versuchstiere wurden verschiedene Schädigungsindices bestimmt (3.2.4). GSI und MSI beurteilten dabei anhand der Entwicklung des glomerulären Mesangiums bzw. der Aufweitung von Kapillargefäßen die glomeruläre

Schädigung. Mit dem VSI wurden pathologische Veränderungen an intrarenalen Gefäßen quantifiziert. Mit der Erhebung des TSI wurde das Tubulussystem und Interstitium beurteilt, wobei dieser Score eine Zusammenschau aus Erhebungen zu Atrophie der Basalmembran, Fibrose, Entzündung und Tubulus-Dilatation ist.

4.2.1 GSI/MSI

Der GSI zeigte eine deutliche Steigerung der glomerulären Schädigung in der Aldosterongruppe im Vergleich zur Kontrolle. Der Durchschnittswert war in der Aldosterongruppe doppelt so hoch wie in der Kontrolle (Abb. 11). Die Behandlungen mit Spironolacton und Sulforaphan konnten die durch Aldosteron hervorgerufene glomeruläre Sklerosierung nahezu vollständig verhindern. Auch die Interventionen mit Apocynin, L-NAME und PDTTC führten zu einem Absinken der Glomerulosklerose im Vergleich zur Aldosterongruppe, doch konnte für diesen Effekt keine statistische Signifikanz gezeigt werden. Die alleinige Gabe von Sulforaphan führte in den Versuchstieren zu den niedrigsten GSI-Werten, wobei für das Absinken des GSI im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte.

Erwartungsgemäß zeigte der MSI ein ähnliches Verteilungsmuster wie der GSI (Abb. 12). Die absoluten Werte lagen dabei etwa um die Hälfte niedriger als beim GSI. Die beobachteten glomerulären Schäden waren folglich mehr durch die Glomerulosklerose bestimmt. Die Aldosterongruppe zeigte auch im MSI eine Verdoppelung der Durchschnittswerte im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Interventionsgruppen konnte für keine Gruppe eine signifikante Reduktion des MSI gezeigt werden. Wie beim GSI zeigte L-NAME den schwächsten Effekt. Die stärkste protektive Wirkung zeigten Spironolacton und PDTTC. Eine Behandlung mit Sulforaphan alleine führte im Vergleich zur Kontrolle zu keinem Absinken des Mesangiolyseindex.

Ergebnisse

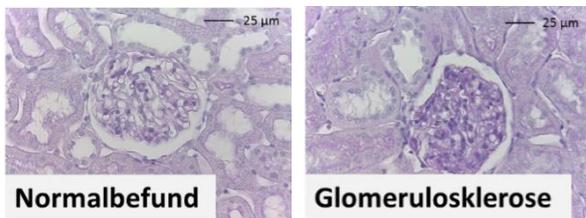
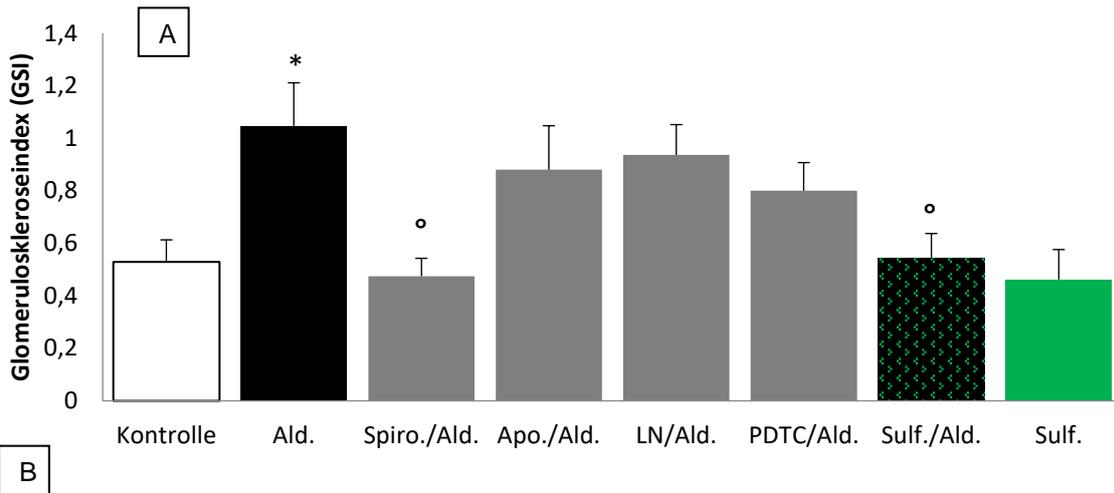


Abb. 11: Semiquantitative Auswertung des Glomeruloskleroseindex (GSI).

A: Paraffinschnitte wurden mittels PAS-Färbung gefärbt und bei 400-facher Vergrößerung mäanderförmig abgefahren. Pro Tier wurden 45 Glomeruli bewertet. Die Auswertung erfolgte analog der Methode nach al Nahas [133] mit Hilfe des Scores unter 3.2.4.1. Gezeigt sind Mittelwert +

Standardfehler. * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Aldosteron. Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, Sulf: Sulforaphan. B: Links histologischer Normalbefund, rechts: Bild eines Glomerulus mit Glomerulosklerose.

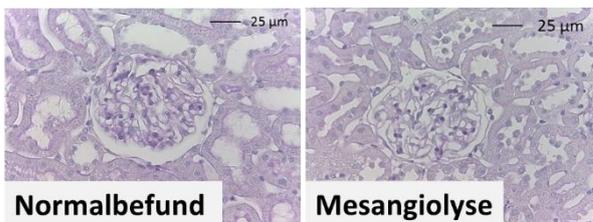
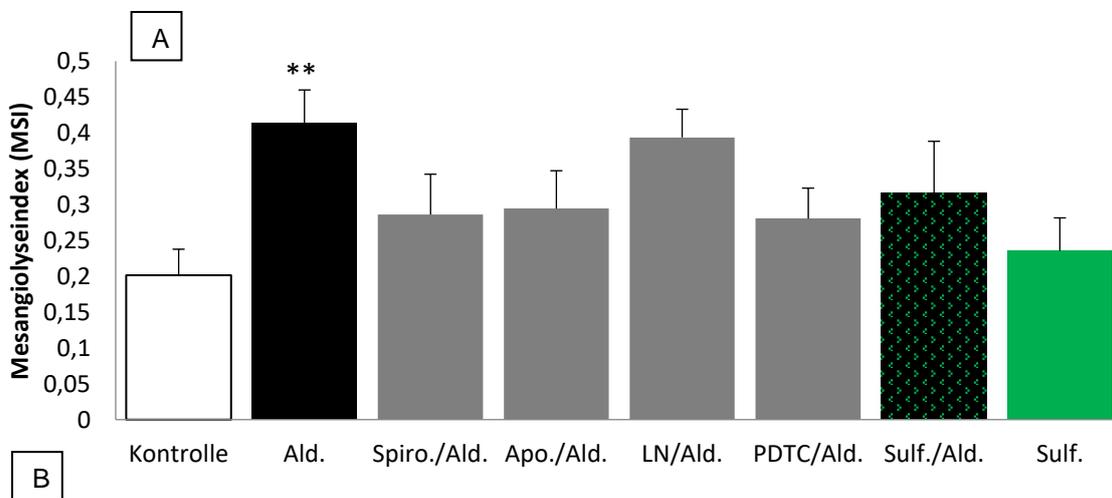


Abb. 12: Semiquantitative Auswertung des Mesangiolyseindex (MSI).

A: Paraffinschnitte wurden mittels PAS-Färbung gefärbt und bei 400-facher Vergrößerung mäanderförmig abgefahren. Pro Tier wurden 45 Glomeruli bewertet. Die Auswertung erfolgte analog der Methode nach al Nahas [133] mit Hilfe des Scores unter 3.2.4.1. Gezeigt sind Mittelwert +

Standardfehler. Auswertung mit Hilfe des Scores unter 3.2.4.1. ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle. Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, Sulf: Sulforaphan. B: Links histologischer Normalbefund, rechts: Bild eines Glomerulus mit Mesangiolyse.

4.2.2 VSI

Aldosteron führte zu einer signifikanten Zunahme der intrarenalen Gefäßwanddicke (Abb. 13). Spironolacton war in der Lage diesen Effekt gänzlich zu verhindern. Beim Vergleich der absoluten Werte zeigte die Spironolactongruppe den geringsten Durchschnittswert mit einem leicht geringeren VSI als die Kontrollgruppe. Die Interventionen mit Apocynin, L-NAME und PDTC konnten ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Aldosteron-vermittelten Gefäßwandschädigung beitragen. Auch die Intervention mit Sulforaphan führte zu einem Absinken der Wandschäden, konnte allerdings keine statistische Signifikanz erreichen. Die alleinige Gabe von Sulforaphan zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen protektiven Effekt.

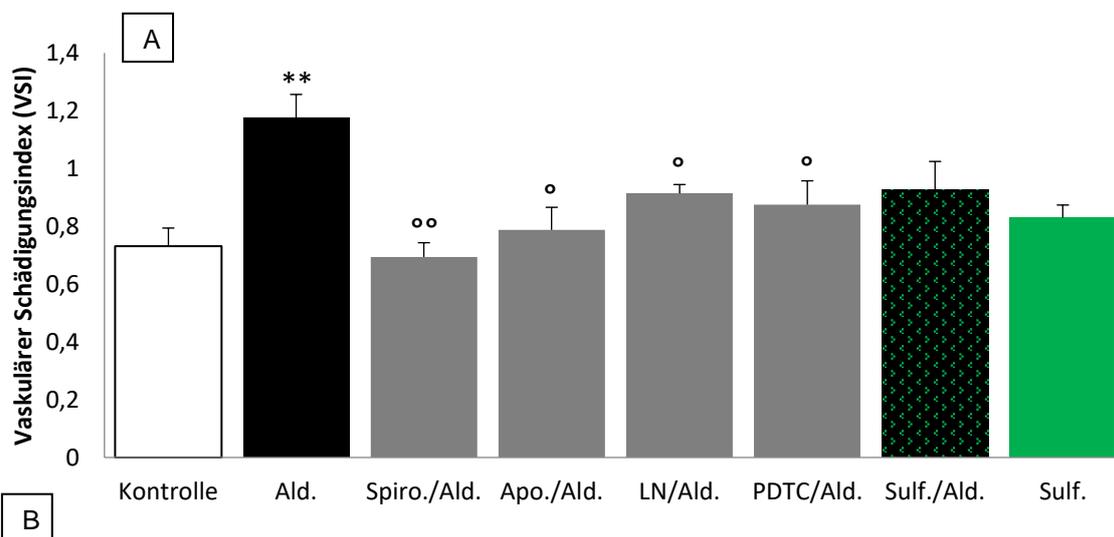


Abb. 13: Semiquantitative Auswertung des vaskulären Schädigungsindex (VSI).

A: Paraffinschnitte wurden mittels HE-Färbung gefärbt und bei 200-facher Vergrößerung mäanderförmig abgefahren. Pro Tier wurden 20 Gefäße bewertet. Die Auswertung erfolgte analog der Methode nach Veniant [134] und mit Hilfe des Scores

unter 3.2.4.2. Gezeigt sind Mittelwert + Standardfehler. ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ald.; °° $p \leq 0,01$ vs. Ald. Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, Sulf: Sulforaphan. B: Links histologischer Normalbefund, rechts: Bild einer pathologisch veränderten Gefäßwand.

4.2.3 TSI

Bei der Bestimmung des tubulointerstitiellen Schädigungsindex (TSI) lagen die Gruppen im zusammengefassten Score sehr eng zusammen und verblieben weitgehend auf dem Niveau der Kontrolle (Abb. 14). Einzig die L-NAME-Gruppe zeigte einen signifikanten Anstieg der tubulären Schädigung im Vergleich zur Kontroll- und Aldosterongruppe. Die alleinige Gabe von Sulforaphan zeigte ein leichtes Absinken im Vergleich zur Kontrollgruppe und damit einen protektiven Effekt auf das Tubulussystem, jedoch konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden. Der TSI ist ein zusammengesetzter Score aus Werten zu Entzündung, Fibrose, Atrophie und Dilatation (vergleiche 3.2.4.3). Die Einzelwerte stellten sich wie folgt dar:

Für die Entzündungswerte konnten zwischen den Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede gezeigt werden. Tendenziell führte Aldosteron zu einem leichten Anstieg interstitieller Entzündung. Dieser Effekt konnte durch Spironolacton, Apocynin und PDTC vollständig verhindert werden. Der Durchschnittswert dieser Gruppen lag noch unter dem der Kontrolle. Eine Behandlung mit Sulforaphan war nicht in der Lage die Aldosteron-vermittelte Entzündung zu verhindern. Den höchsten Wert zeigte die Gruppe welche L-NAME und Aldosteron bekommen hatte.

Bei der Bestimmung der Fibrose wurden durchweg höhere Werte erzielt, so dass der finale TSI von den Werten für Fibrose beeinflusst wurde. Die Gruppen lagen dabei sehr nahe zusammen. Einzig für die Intervention mit L-NAME konnte eine statistisch signifikante Zunahme der Fibrose gegenüber der Kontroll- und Aldosterongruppe gezeigt werden.

Bei der tubulären Atrophie zeigte die Aldosterongruppe keine Zunahme. Die Intervention mit L-NAME führte zu einem deutlichen Anstieg, welcher zur Aldosterongruppe signifikant war. Die alleinige Gabe von Sulforaphan führte zu einem Absinken der Werte im Vergleich zur Kontrolle, konnte jedoch für diesen protektiven Effekt keine Signifikanz erreichen.

Die tubuläre Dilatation war selten. Einzig die Intervention mit L-NAME zeigte einen signifikanten Anstieg, sowohl zur Kontrolle als auch zur Aldosterongruppe.

Ergebnisse

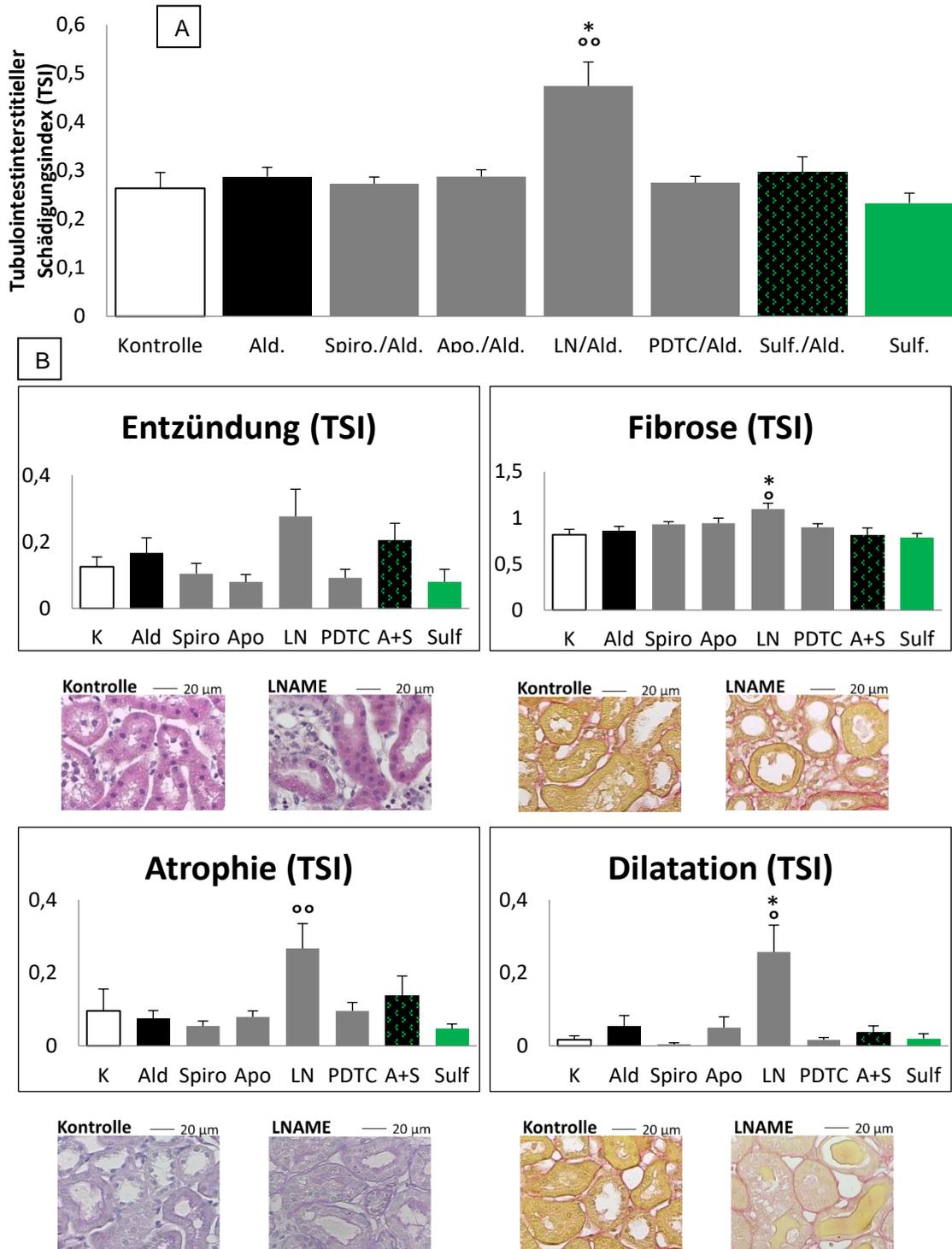


Abb. 14: Semiquantitative Auswertung des tubulointerstiellen Schädigungsindex (TSI) und gesonderte Darstellung der einzelnen Score-Bestandteile.

A: Darstellung des TSI. Der TSI wurde analog der Methode nach Veniant [134] und mit Hilfe des Scores unter 3.2.4.3 bestimmt. Dabei wurden folgenden Färbungen auf Paraffinschnitten verwendet: Siriusrot zur Bestimmung von Fibrose und Tubulusdilatation, HE zur Bestimmung von Entzündung (Leukozytenansammlungen) und PAS für die Beurteilung der Atrophie der Basalmembran. B: Gesonderte Darstellung der einzelnen Score-Bestandteile, mit jeweils repräsentativem histologischem Beispielbefund der Kontrolle und der L-NAME-Gruppe. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardfehler. * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ald.; °° $p \leq 0,01$ vs. Ald. K: Kontrolle, Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, L-N: L-NAME, S-A: Sulforaphan-Aldosteron, Sulf: Sulforaphan.

4.3 Aldosteron führt zur Bildung von ROS

Das Vorliegen von oxidativem Stress wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium (DHE) auf Gefrierschnitten untersucht. DHE signalisiert dabei die Anwesenheit von ROS durch eine rötliche Fluoreszenz, welche nach Oxidation des Farbstoffs emittiert wird. Die Intensität der Fluoreszenz wurde mit dem Programm CellProfiler 2.0 durch eine Messung der Grauintensitäten ermittelt. In der Auswertung zeigte sich, dass Aldosteron zu einer Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies führte (Abb. 15). Durch die Interventionen konnte die ROS-Menge gesenkt werden. Eine Ausnahme stellte hierbei die L-NAME-Gruppe dar, in welcher es zu keiner Absenkung der ROS-Werte kam. Am deutlichsten zeigte sich die Reduktion von ROS in den Gruppen mit einer Intervention mit Spironolacton und mit PDTC. Für keines der Ergebnisse konnte mittels ANOVA statistische Signifikanz gezeigt werden. Um dennoch zu überprüfen, ob der offensichtliche Unterschied zwischen Kontrolle und Aldosteron statistisch signifikant ist, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, der bestätigte, dass es einen signifikanten Anstieg des oxidativen Stresses in der Aldosterongruppe gab.

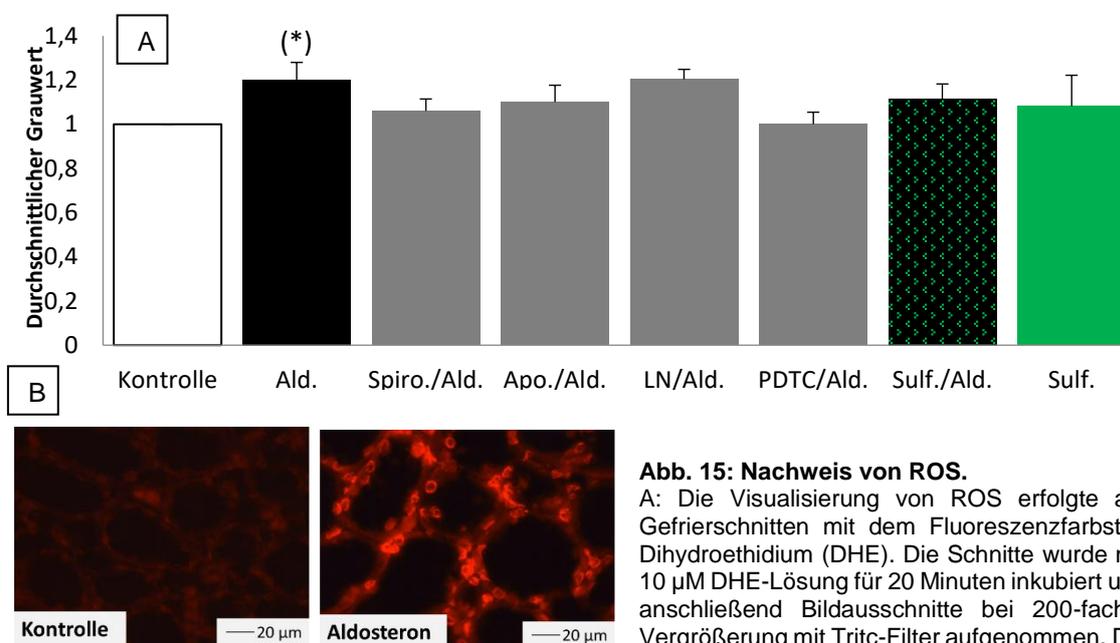


Abb. 15: Nachweis von ROS.

A: Die Visualisierung von ROS erfolgte auf Gefrierschnitten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dihydroethidium (DHE). Die Schnitte wurde mit 10 µM DHE-Lösung für 20 Minuten inkubiert und anschließend Bildausschnitte bei 200-facher Vergrößerung mit Tritc-Filter aufgenommen. Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte durch

Messung der Grauwerte mit dem Programm Cellprofiler [132] und wurde auf die Kontrollgruppe normiert. Pro Tier wurden min. 7 Bilder ausgewertet. Gezeigt sind Mittelwert + Standardfehler. (*) $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle im ungepaarten t-Test. B: Repräsentative Beispielbilder DHE-gefärbter Gefrierschnitte der Kontrolle (links) und der Aldosterongruppe (rechts).

4.4 Die Aktivierung von Nrf2 durch Aldosteron und durch Sulforaphan

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 ist der Hauptregulator der antioxidativen Abwehr. Er kann durch vermehrtes Anfallen von ROS, durch Modifikation von Keap1 oder über die PKC aktiviert werden. Nach seiner Aktivierung löst sich Nrf2 von Keap1 und es erfolgt die Translokation in den Zellkern. Dort bindet er an die Promotorregion antioxidativer Gene und veranlasst deren Expression. Mittels immunhistochemischer Färbung wurde Nrf2 im Zellkern sichtbar gemacht und im Anschluss quantifiziert (3.2.2)

Im Kortex führte Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle durchschnittlich zu einer Verdreifachung der Nrf2-positiven Kerne (Abb. 16). Spironolacton war in der Lage, diese Aktivierung vollständig zu verhindern; der Durchschnittswert der Spironolactongruppe war gleich dem der Kontrolle. Auch die Interventionen mit Apocynin, L-NAME und PDTC führten zu einer deutlichen Reduktion der Nrf2 Aktivierung. Die Einnahme von Sulforaphan führte sowohl mit als auch ohne Aldosteron zu einer deutlichen Nrf2-Aktivierung und im Vergleich zur Kontrolle zu bis zu vierfach erhöhten Durchschnittswerten.

Im Nierenmark zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster, wobei die Anzahl Nrf2-positiver Kerne insgesamt höher ausfiel. Aldosteron führte hier zu deren Verdoppelung (Abb. 16). Spironolacton und Apocynin verhinderten die zusätzliche Aktivierung vollständig, wobei Apocynin mit seinem Durchschnittswert unter dem der Kontrolle lag. Auch die Interventionen mit L-NAME und PDTC konnten die Aktivierung von Nrf2 verhindern. Die Einnahme von Sulforaphan führte zur stärksten Nrf2-Aktivierung. Die Gruppe, welche Aldosteron zuzüglich Sulforaphan erhalten hatte, wies analog zur Verteilung im Nierenkortex den höchsten Wert auf.

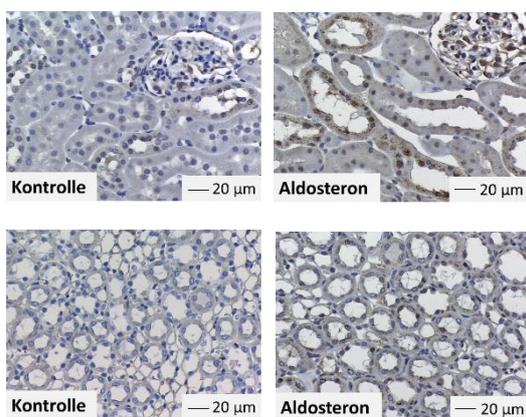
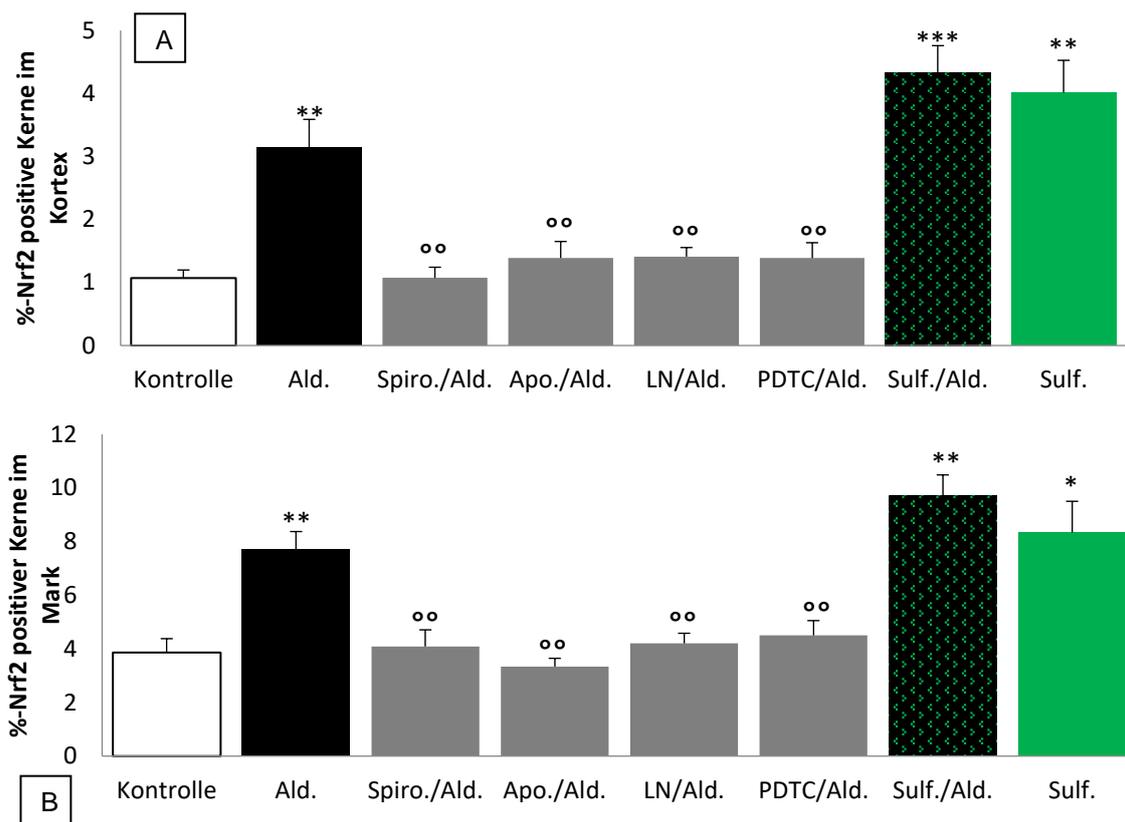


Abb. 16 Immunhistochemischer Nachweis von Nrf2 im Nierenkortex und Nierenmark.

A: Nrf2 wurde im Zellkern mittels immunhistochemischer Färbung nachgewiesen und quantifiziert. Die positiv gefärbten Kerne wurden in Relation zur Gesamtzahl der Zellkerne gesetzt. Die Bestimmung der Gesamtzahl erfolgte mit dem Programm Cellprofiler 2.0 [132]. Pro Tier wurden von Kortex und Mark jeweils 8 Bilder ausgewertet. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle; ** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle; * $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle; oo $p \leq 0,01$ vs. Ald. Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, Sulf: Sulforaphan. B: Repräsentative Beispielbilder Nrf2-gefärbter Schnitte der Kontrolle und Aldosterongruppe (obere Reihe Nierenkortex, untere Reihe Nierenmark)

4.5 Beeinflussung der Expression antioxidativer Proteine

Wie unter 4.4 gezeigt werden konnte, führten Aldosteron und Sulforaphan zu einer verstärkten Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2. Um die Auswirkungen der Nrf2-Aktivierung auf die antioxidative Abwehr zu messen wurde die Expression verschiedener antioxidativer Schlüsselenzyme mittels Western-Blot nachgewiesen und mit dem Programm ImageJ [136] quantifiziert.

4.5.1 Superoxiddismutase (SOD1)

Die Superoxiddismutase katalysiert die Umwandlung von Superoxiden zu H_2O_2 und ist damit ein Kernenzym im Abbau von ROS. Weder die Aldosteron- noch die Interventionsgruppen zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg (Abb. 17). Die alleinige Behandlung mit Sulforaphan führte zu den höchsten Werten für SOD1, wobei auch hierfür keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte.

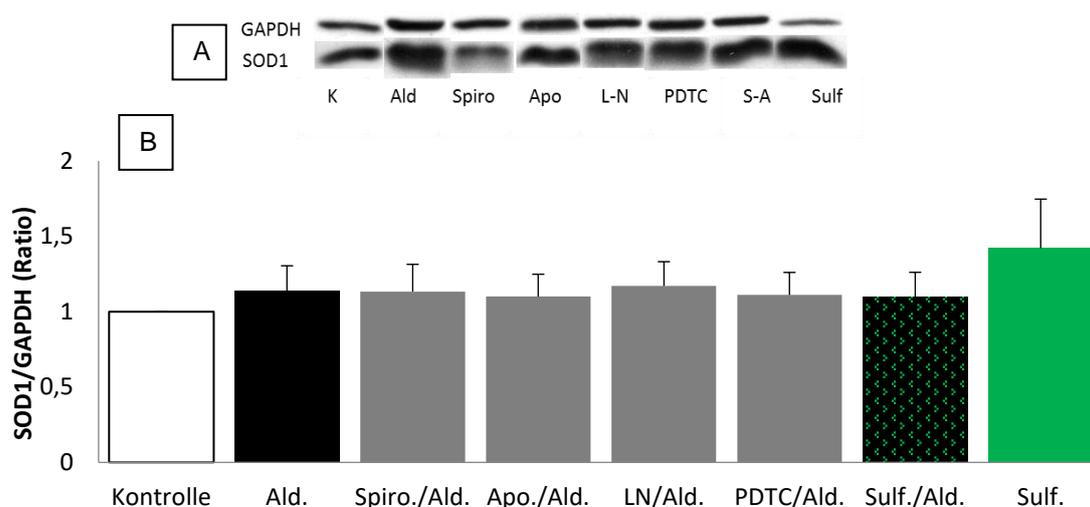


Abb. 17: Expression von SOD1

A: Repräsentative Westernblots, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots zur Expression von SOD1 und dem Referenzprotein GAPDH. B: Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler von 8 Versuchstieren (bzw. 5 Tieren in der Sulforaphangruppe). Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageJ [136] und durch Beziehen von SOD1 auf das Referenzprotein GAPDH. K: Kontrolle, Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, S-A: Sulforaphan-Aldosteron, Sulf: Sulforaphan.

4.5.2 Auswirkungen auf das Glutathion- und Thioredoxinsystem

Das Glutathion- und das Thioredoxinsystem sind zwei der wichtigsten Redoxsysteme der menschlichen Zelle. Zur Analyse des Glutathionsystems wurde die katalytische Untereinheit (GCLC) der Glutamatcysteinylgase quantifiziert. Diese reguliert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Glutathionsynthese. Für die Aldosterongruppe konnte keine vermehrte Expression von GCLC gezeigt werden, auch die Interventionsgruppen zeigten keine signifikante Abweichung. Die alleinige Gabe von Sulforaphan führte zu den höchsten Durchschnittswerten, wobei auch hierfür keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

Ergebnisse

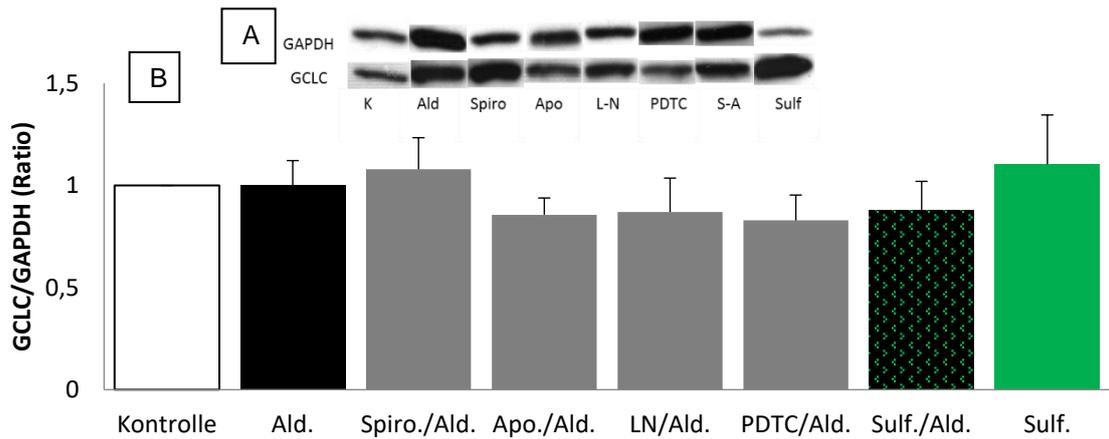


Abb. 18: Expression von GCLC.

A: Repräsentative Westernblots, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots zur Expression von GCLC und dem Referenzprotein GAPDH. B: Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler von 8 Versuchstieren (bzw. 5 Tieren in der Sulforaphangruppe). Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageJ [136] und durch Beziehen von GCLC auf das Referenzprotein GAPDH. K: Kontrolle, Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, L-N: L-NAME, S-A: Sulforaphan/Aldosteron, Sulf: Sulforaphan.

Die Thioredoxinreduktase (TrxR1) bildet mit Thioredoxin und NADPH ein wichtiges Redoxsystem [113]. Weder die Aldosterongruppe noch die Interventionen zeigten einen signifikanten Anstieg von TrxR1 (Abb. 19). Die Gabe von PDTC führte zu einem signifikanten Absinken der TrxR1-Expression im Vergleich zu Aldosterongruppe. Die alleinige Gabe von Sulforaphan führte zu einem Anstieg der Werte für TrxR1 im Vergleich zur Kontrolle, wobei dieser Effekt statistisch nicht signifikant war.

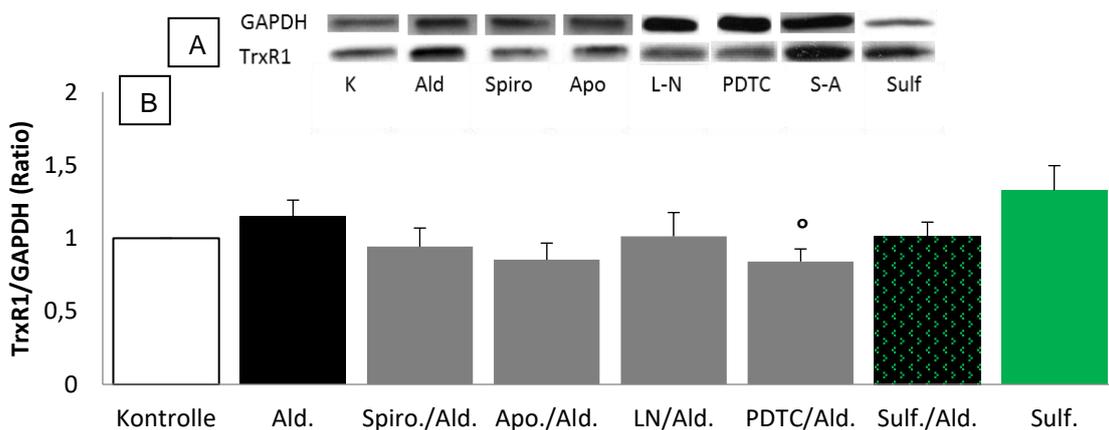


Abb. 19: Expression der Thioredoxinreduktase TrxR1.

A: Repräsentative Westernblots, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots zur Expression von TrxR1 und dem Referenzprotein GAPDH. B: Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler von 8 Versuchstieren (bzw. 5 Tieren in der Sulforaphangruppe). Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageJ [136] und durch Beziehen von TrxR1 auf das Referenzprotein GAPDH. ° $p \leq 0,05$ vs. Ald. K: Kontrolle, Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, L-N: L-NAME, S-A: Sulforaphan/Aldosteron, Sulf: Sulforaphan.

4.5.3 Auswirkung auf die Expression von HO-1

HO-1 katalysiert den Abbau von freiem Häm zu Fe^{2+} , CO und Biliverdin bzw. Bilirubin. Freies Häm kann mittels Fenton-Reaktion zur Bildung von OH^- aus H_2O_2 führen. Die Abbauprodukte des Häms haben hingegen eine antioxidative und zytoprotektive Funktion (vergleiche 1.6.3). Für Aldosteron konnte keine Steigerung der Expression von HO-1 gezeigt werden (Abb. 20). L-NAME und PDTC führten zu einem signifikanten Anstieg von HO-1 im Vergleich zur Aldosterongruppe. Bei der gemeinsamen Gabe von Sulforaphan und Aldosteron blieb HO-1 auf dem Niveau der Kontrolle. Die alleinige Gabe von Sulforaphan führte zu einem deutlichen Anstieg der HO-1 Expression und mithin zu den höchsten Werten, es konnte jedoch gegenüber der Kontrollgruppe keine Signifikanz für diesen Anstieg gezeigt werden.

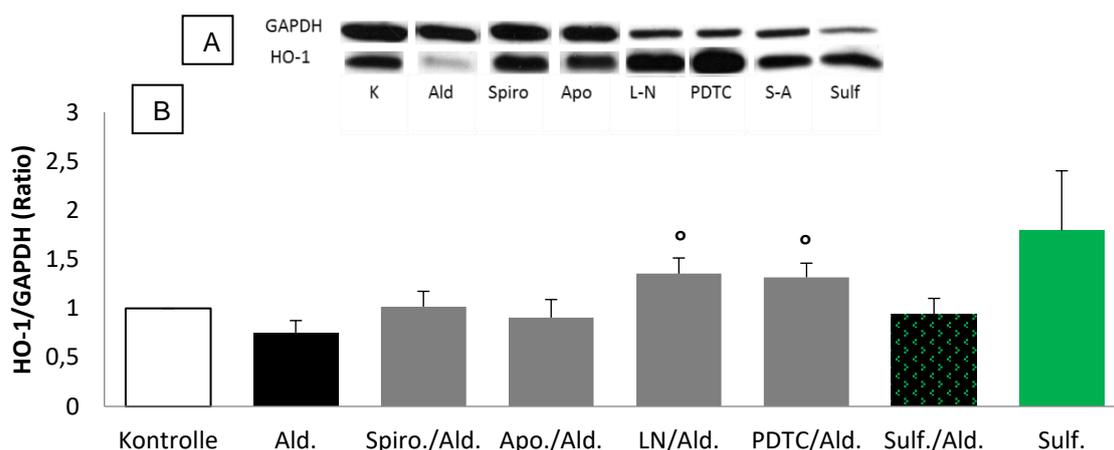


Abb. 20: Expression von HO-1.

A: Repräsentative Westernblots, zusammengesetzt aus verschiedenen Blots zur Expression von HO-1 und dem Referenzprotein GAPDH. B: Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler von 8 Versuchstieren (bzw. 5 Tieren in der Sulforaphangruppe). Quantifizierung erfolgte mit dem Programm ImageJ [136] und durch Beziehen von TrxR1 auf das Referenzprotein GAPDH. ° $p \leq 0,05$ vs. Ald. K: Kontrolle, Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, L-N: L-NAME, S-A: Sulforaphan/Aldosteron, Sulf: Sulforaphan.

4.6 Aldosteron-vermittelte Genomschädigung (γ -H2AX)

Zum Nachweis von DNA-Schäden wurden Paraffinschnitte der Nieren mit einem Antikörper gegen γ -H2AX immunhistochemisch gefärbt (3.2.2). Das Histon H2AX kommt in allen eukaryontischen Zellen vor. Es ist eine Sonderform des Histons H2A. Dieses bildet mit anderen Histonen im Zellkern Oktamere, um welche die DNA gewunden ist. Sie tragen zur Stabilisierung und Kondensation der DNA bei.

Im Falle von DNA-Doppelstrangbrüchen kommt es zur Phosphorylierung benachbarter H2AX-Histone am Serin 139 [137]. Sie werden nun γ -H2AX genannt. Durch die Phosphorylierung wird eine nachfolgende Kaskade von DNA-Reparaturmechanismen aktiviert [138]. Der Nachweis von γ -H2AX findet als sensitive Methode zur Quantifizierung von DNA-Schäden breite Anwendung [139]. Mittels immunhistochemischer Färbung wurde γ -H2AX im Zellkern sichtbar gemacht und im Anschluss quantifiziert (3.2.2).

Im Nierenkortex führte Aldosteron zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Schäden. Die Aldosterongruppe zeigte mehr als eine Verdoppelung der geschädigten Kerne (Abb. 21). Alle Interventionen waren in der Lage die durch Aldosteron verursachten DNA-Schäden im Kortex zu reduzieren. Mit Ausnahme der L-NAME-Gruppe waren diese protektiven Effekte auch statistisch signifikant. Keine Intervention war in der Lage, die genotoxische Wirkung von Aldosteron vollkommen zu verhindern. Den stärksten Effekt hatten die Behandlungen mit PDTC und Sulforaphan, dicht gefolgt von Spironolacton. Die alleinige Einnahme von Sulforaphan zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen protektiven Effekt.

Im Nierenmark zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster der DNA-Schäden wie im Nierenkortex, wobei die Anzahl γ -H2AX-positiver Zellkerne insgesamt höher lag. Auch hier führte Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle zu mehr als einer Verdoppelung der geschädigten Kerne (Abb. 21). In allen Interventionsgruppen konnte eine signifikante Reduktion der Aldosteron-vermittelten Genomschädigung erzielt werden, wobei auch hier keine Intervention in der Lage war die DNA-Schäden vollkommen zu verhindern. Spironolacton zeigte im Nierenmark den stärksten protektiven Effekt. Die alleinige Behandlung mit Sulforaphan zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine zusätzliche Reduktion von DNA-Schäden.

Ergebnisse

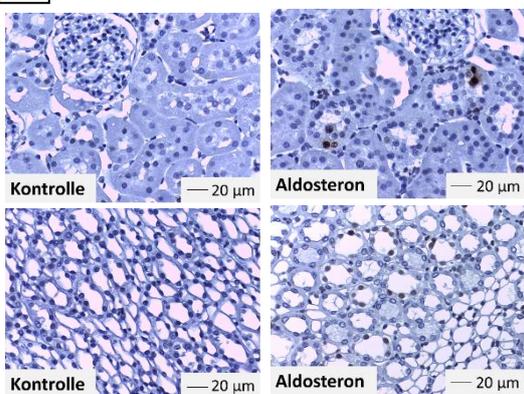
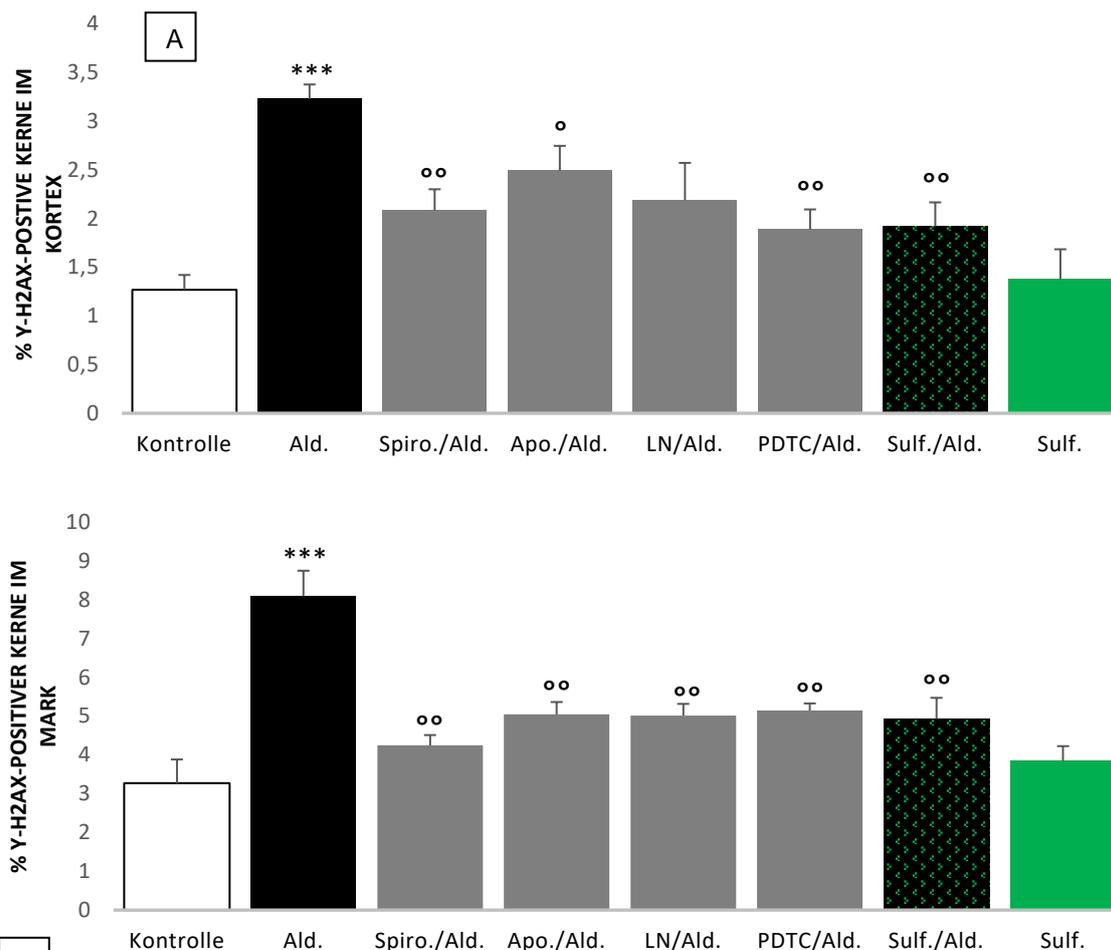


Abb. 21 Immunhistochemischer Nachweis von γ -H2AX auf Paraffinschnitten im Nierenmark und im Nierenkortex.

A: DNA-Doppelstrangbrüche wurden mittels immunhistochemischer Färbung von γ -H2AX im Zellkern sichtbar gemacht und quantifiziert. Die positiv gefärbten Kerne wurden in Relation zur Gesamtanzahl der Zellkerne gesetzt. Die Bestimmung der Gesamtzahl erfolgte mit dem Programm Cellprofiler 2.0 [132]. Pro Tier wurden von Kortex und Mark jeweils 8 Bilder ausgewertet. Gezeigt ist der Mittelwert + Standardfehler. *** $p \leq 0,001$ vs. Kontrolle; ° $p \leq 0,05$ vs. Ald.; °° $p \leq 0,01$ vs. Ald. Ald: Aldosteron, Spiro: Spironolacton, Apo: Apocynin, LN: L-NAME, Sulf: Sulforaphan.

B: Repräsentative Beispielbilder γ -H2AX-gefärbter Schnitte der Kontrolle und Aldosterongruppe (obere Reihe Nierenkortex, untere Reihe Nierenmark)

5 Diskussion

Patienten mit erhöhten Aldosteronspiegel zeigen eine gesteigerte Inzidenz für Malignome, insbesondere zeigt sich bei diesen Patienten ein vermehrtes Vorkommen von Nierenzellkarzinomen [26]. Des Weiteren zeigen Patienten mit ausgeprägter Herzinsuffizienz sowie nach stattgehabtem Myokardinfarkt einen Überlebensvorteil durch eine Aldosteronrezeptorblockade [48, 49]. Auch profitieren Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz von einer zusätzlichen Therapie mit Spironolacton [140]. *In vitro*- und Tiermodellstudien zeigen, dass es durch Aldosteron zur Entstehung von oxidativem Stress kommt, welcher eine entscheidende Bedeutung für die Aldosteron-vermittelten Organ- und Genomschäden zu haben scheint [33, 141]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Aldosteron über eine Aktivierung von Nox und NOS sowie über NF- κ B zu oxidativem Stress im Nierengewebe führt [124, 129]. Diesem oxidativen Stress stehen antioxidative Schutzmechanismen entgegen, welche maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert werden. Ziel dieser Arbeit war es, die Aldosteron-vermittelte oxidative Nierenschädigung näher zu analysieren sowie den Einfluss der antioxidativen Abwehr zu beurteilen.

5.1 Aldosteron führt MR-abhängig zu histopathologischen Schäden in der Niere mit Schwerpunkt auf Glomeruli und Gefäßwand.

Mit Fortbestehen der Erkrankung kommt es in hypertensiven Patienten regelmäßig zu einem Verlust der Nierenfunktion und zunehmender Proteinurie. Es können Probleme in der Filtration und im Bereich der Konzentration des Harns durch Schäden der Glomeruli bzw. der Tubuluszellen verursacht werden [142]. Um die Auswirkung von erhöhten Aldosteronleveln auf das Nierengewebe der Versuchstiere zu beurteilen, wurden histopathologische Schädigungsscores erstellt und die Gruppen mit der Kontrolle bzw. der Aldosterongruppe verglichen. Aldosteron führte in unserem Versuch zu strukturellen Veränderungen insbesondere der Glomeruli und der Gefäßwände. Die Aldosterongruppe zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Zunahme der glomerulären Sklerose.

Die Intervention mit Spironolacton war in der Lage, diese Auswirkung vollständig zu verhindern, so dass die Werte für den GSI in der Spironolacton/Aldosterongruppe denen der Kontrolle entsprachen. Die Interventionen mit Apocynin, L-NAME und PDTC führten zwar zu niedrigeren Werten als die der Aldosterongruppe, waren aber nicht in der Lage, die Auswirkungen von Aldosteron auf Glomerulosklerose signifikant zu reduzieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Aldosteron über den MR zu einer Schädigung der Nierenkörperchen führt, und dies maßgeblich durch eine Zunahme von glomerulärem Bindegewebe geschieht. Des Weiteren deuten sie darauf hin, dass die Zunahme von oxidativem und nitrosativem Stress bzw. die Aktivierung von NF- κ B mitverantwortlich, aber nicht alleinig ursächlich, für diese histopathologischen Schäden durch Aldosteron sind. Die vollständige Verhinderung durch Spironolacton legt den Schluss nahe, dass die Aktivierung des MR durch Aldosteron ein gemeinsamer Startpunkt mehrerer, teilweise voneinander unabhängiger, glomerulotoxischer Prozesse ist. Neben einer Steigerung von oxidativem Stress könnte eine durch Aldosteron vermittelte Aktivierung von TGF- β eine Rolle gespielt haben. *In vitro* ließ sich zeigen, dass Aldosteron in Mesangiumszellen zu einer Zunahme von TGF- β führt [143]. Für Angiotensin II konnte bereits *in vivo* gezeigt werden, dass es zu einer Erhöhung von TGF- β kommt und dieses zu einer Steigerung der Kollagensynthese und Proliferation von Fibroblasten in den Nieren von Ratten führt [144]. Daneben kann Aldosteron auch zu einer gesteigerten Expression des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) führen, wobei diese Aktivierung unabhängig von TGF- β oder gesteigerten ROS-Leveln erfolgt [145]. Eine erhöhte PAI-1 Aktivität kann zu unkontrolliertem Anfallen von extrazellulärer Matrix und Nierenfibrose führen [146]. Diese unterschiedlichen und teilweise von oxidativem Stress unabhängigen Mechanismen könnten eine Erklärung dafür bieten, dass zwar die Blockade des MR, als gemeinsamer Startpunkt, einen effektiven Schutz vor der durch Aldosteron verursachten Glomerulosklerose bietet, doch die Blockade einzelner Enzyme durch Apocynin und L-NAME bzw. Transkriptionsfaktoren durch PDTC keinen signifikanten Schutz zeigte.

Neben der Intervention mit Spironolacton führt auch die Gabe von Sulforaphan zu einer wirksamen Reduktion der Glomerulosklerose. Sulforaphan führt zu einer Aktivierung des Nrf2-Signalweges und hierüber zu einer Steigerung der antioxidativen Abwehr bzw. zur Verhinderung von oxidativem Stress. Zwar war die Nrf2-Aktivität signifikant gesteigert, doch fand sich in unserem Versuch kein durchschlagender Effekt im Bereich der Synthese antioxidativer Enzyme. Auch waren die ROS-Level in der Sulforaphan/Aldosteron Gruppe höher als z.B. in der PDTC-Interventionsgruppe und dennoch konnte Sulforaphan die Glomerulosklerose deutlich effektiver verhindern als PDTC. Das deutet daraufhin, dass die glomeruläre Schädigung durch Aldosteron teilweise unabhängig von oxidativem Stress war. Neben dem positiven Effekt auf Nrf2 konnte für Sulforaphan auch ein hemmender Effekt auf die Aktivierung pro-inflammatorischer Faktoren wie TNF- α oder fibro-proliferativer Signalwege wie z.B. TGF- β oder PAI-1 gezeigt werden [147, 148]. Es scheint daher, dass Sulforaphan neben seiner antioxidativen Eigenschaft, die Fibrose fördernden Aldosteronwirkungen auf weiteren Ebenen verhindern konnte.

Neben den Schäden an den Nierenkörperchen führte Aldosteron in den renalen Gefäßen der Versuchstiere zu einer deutlichen Zunahme der Gefäßwanddicke. In der Spironolactongruppe ließ sich dieser proliferative Effekt vollständig verhindern, so dass davon auszugehen ist, dass auch dieser Effekt über den MR vermittelt wurde. Das deckt sich mit bisherigen Erkenntnissen, die davon ausgehen, dass der vaskuläre Effekt von Aldosteron maßgeblich über den MR vermittelt wird, welcher ubiquitär in den Zellen der Gefäßwand ausgebildet wird. Hierbei wird angenommen, dass Aldosteron durch die Induktion von Proliferation, Fibrosierung und Inflammation zum Remodeling der Gefäßwände führt [149], wobei der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist. Der Aktivierung pro-oxidativer Enzyme durch den MR scheint dabei eine wichtige Rolle zuzukommen; so zeigte eine Inhibition der pro-oxidativen Enzyme Nox und NOS durch Apocynin und L-NAME eine signifikante Reduktion der gefäßproliferativen Effekte. Passend dazu konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen, dass Aldosteron im Nierengewebe von Ratten über die Erzeugung von oxidativem Stress zu einer Aktivierung von ERK 1/2 und einem ihrer Transkriptionsfaktoren,

STAT3, führt [150]. MAP-Kinasen wie z.B. ERK und p38 haben eine wichtige Rolle in der von Aldosteron vermittelten Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen der Gefäßwand [151, 152]. MAP-Kinasen führen beispielsweise zur Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie IGF-1 [153] oder Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B [154]. NF- κ B kann selbst oxidativen Stress durch die Synthese prooxidativer Enzyme verstärken und Zellteilung und Fibrose veranlassen [155]. Passend dazu zeigte die Blockade von NF- κ B mittels PDTC im vorliegenden Versuch eine signifikante Reduktion des VSI bzw. der Aldosteron-vermittelten Gefäßproliferation. Sulforaphan zeigte auch im Bereich der Gefäßwand einen protektiven Effekt. Dieser blieb hinter dem Effekt im Bereich der Glomeruli zurück und konnte keine statistische Signifikanz erreichen. Dies könnte auf einen gewebespezifischen Effekt von Sulforaphan hindeuten, aber auch unterschiedliche Anreicherungen bzw. Wirkspiegel im Bereich der Gefäßwand und der Glomeruli könnten eine Erklärung sein.

Eine histopathologische Auswirkung von Aldosteron auf das tubulointerstitielle System ließ sich in unserem Versuch nicht nachweisen; obwohl die immunhistochemische Färbung einen deutlichen Anstieg von DNA-Schäden durch Aldosteron sowohl im Nierenkortex als auch im Nierenmark nachwies, zeigten diese DNA-Schäden im Bereich der Tubuli kein histomorphologisches Korrelat. Dieser ausbleibende Effekt könnte an der Versuchsdauer gelegen haben. Eventuell war eine Exposition von 4 Wochen (noch) nicht ausreichend, um zu eindeutigen Veränderungen im Bereich der Tubuli zu führen. Relevante tubulointerstitielle Schäden fanden sich einzig in der Gruppe, welche L-NAME/Aldosteron bekam. Diese Tiere zeigten sowohl gegenüber der Kontrolle als auch der Aldosterongruppe eine signifikante Steigerung der tubulointerstitiellen Schädigung. Andere Studien konnten bereits zeigen, dass es bei einer übermäßigen Blockade von endogenem NO durch die Gabe von L-NAME zu einem dauerhaften Anstieg des arteriellen Blutdrucks, einer Abnahme der Nierenfunktion und einer Zunahme von Proteinurie und renalen Schäden kommt [156, 157]. Diese Auswirkungen von L-NAME sind dosis- und zeitabhängig und bereits bei einer täglichen oralen Gabe von 5mg/kgKG * Tag zu beobachten [158]. Die hier gemachten Beobachtungen lassen sich damit gut

durch die Gabe von L-NAME erklären. Ziel dieser Behandlung war es, eine durch Aldosteron gesteigerte Aktivität von NOS zu hemmen. Die verwendete Dosis von 25mg/kgKG * Tag scheint dabei zu hoch gewählt, so dass nicht nur ein Überschuss an NO verhindert wurde, sondern auch die physiologisch notwendige Basisversorgung mit NO ausblieb und der nephrotoxische Einfluss von L-NAME überwog. Die beobachteten tubulären Schäden könnten auch Folge des erhöhten Blutdrucks in der L-NAME-Gruppe sein, dieser war sowohl im Vergleich zur Kontrolle als auch zur Aldosterongruppe signifikant gesteigert. Allerdings konnte in der Aldosterongruppe im Vergleich zur Kontrolle, trotz eines signifikant erhöhten Blutdrucks, keine vermehrte tubuläre Schädigung nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte L-NAME im Bereich des GSI, MSI und VSI, trotz einer signifikanten Steigerung des Blutdrucks, im Vergleich zur Aldosterongruppe eine Reduktion des jeweiligen Scores. Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse gegen einen entscheidenden Einfluss des Blutdrucks auf die beobachteten histopathologischen Veränderungen.

5.2 Aldosteron führt zur Bildung von ROS

Freie Sauerstoffradikale haben eine wichtige Funktion in der Regulation zellulärer Prozesse, doch das vermehrte und dauerhafte Anfallen von ROS führt zu oxidativem Stress in der Zelle und schädigt Proteine, Lipide und die DNA [74]. In Patienten mit erhöhten Aldosteronleveln, beispielsweise im Rahmen einer chronischen Herzinsuffizienz oder eines primären Hyperaldosteronismus, konnten vermehrte Plasmamarker für oxidativen Stress festgestellt werden [57, 159]. Daran anknüpfend konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass Aldosteron beispielsweise im Herzen, in Gefäßwänden und in den Nieren zu gesteigertem oxidativem Stress führt [33]. In vorherigen Arbeiten zeigte unsere Arbeitsgruppe bereits, dass Aldosteron über den MR zu einer calciumabhängigen Aktivierung von Nox und NOS führt [124]. Im aktuellen Versuch wurden die ROS-Level im Nierengewebe der Versuchstiere mittels DHE-Färbung quantifiziert und im Anschluss auf die Kontrollgruppe normiert und mit dieser sowie mit der Aldosterongruppe verglichen. Aldosteron führte im Durchschnitt zu 20 % höheren ROS-Werten als in der Kontrollgruppe. Dieser Anstieg konnte durch eine

Blockade des MR mit Spironolacton weitgehend verhindert werden. Auch die Interventionen mit Apocynin und Sulforaphan führten zu einer Abnahme des ROS-Anstiegs und zeigten durchschnittlich nur um 10 % gesteigerte ROS-Level im Vergleich zur Kontrolle. Eine Blockade der NOS mittels L-NAME zeigte keinen Effekt. Eine Behandlung mittels PDTC führte zum stärksten Absenken der ROS-Werte. In dieser Gruppe konnte der durch die Aldosterongabe zu erwartende Anstieg weitgehend verhindert werden und die Versuchstiere wiesen lediglich um 6 % gesteigerte Werte für oxidativen Stress auf. Eine Blockade von NF- κ B beispielsweise im Gehirn oder im Bereich akuter Entzündung führt zu einem Absenken von oxidativem Stress [160, 161]. Es konnte gezeigt werden, dass NF- κ B die Expression von pro-oxidativen Enzymen wie z.B. Nox2 (gp91phox) [162] oder iNOS [163] veranlassen, aber auch die Synthese antioxidativer Enzyme wie z.B. TrxR1 oder HO-1 initiieren kann [155]. Der genaue Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt, die Funktion von NF- κ B scheint von Zellart und Kontext abhängig [164]. In vorherigen Arbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Aldosteron im Nierengewebe über die Entstehung von oxidativem Stress zu einer Aktivierung von NF- κ B führt [129]. Die aktuellen Beobachtungen deuten darauf hin, dass NF- κ B nach seiner Aktivierung zu einer weiteren Steigerung des oxidativen Stresses führt, welche durch die Blockade mittels PDTC verhindert wurde. Statistische Signifikanz konnte dabei jedoch nur für den Anstieg an oxidativem Stress in der Aldosterongruppe im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Dies gelang auch erst nach ergänzendem ungepaarten t-Test. Eine Erklärung für den vergleichsweise relativ geringen Unterschied der absoluten Werte unter den Gruppen könnte in der verwendeten Nachweismethode mittels DHE liegen. DHE reagiert in der Anwesenheit von O_2^- zu Ethidium. Dieses wird klassischerweise bei einer Wellenlänge von 500-530nm angeregt und emittiert eine Fluoreszenz bei 590-620nm. Neben der Reaktion zu Ethidium reagiert DHE auch zu 2-Hydroethidium (EOH) welches ein leicht verändertes Erregungs- (480nm) und Emissionsspektrum (567nm) hat [165]. Der verwendete TRITC-Aufsatz benutzt einen Erregungsfilter von 540/25 und einen Barrierefilter von 605/55. Das könnte dazu geführt haben, dass anfallendes EOH eventuell nur ungenügend nachgewiesen wurde und die Unterschiede zwischen den einzelnen

Gruppen nicht deutlicher ausfielen. Ebenso könnte es sich bei den durch die Aldosteronbehandlung anfallenden ROS nicht um Superoxidradikale handeln oder diese könnten sich über eine rasche Verstoffwechselung dem Nachweis mittels DHE entziehen [166]. Allerdings konnten in einem vorherigen Versuch unserer Arbeitsgruppe, in welchem die Versuchstiere die Aldosteronvorstufe DOCA erhielten, mittels DHE signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden [128]; jedoch war die Versuchsdauer hierbei auf 6 Wochen festgelegt gewesen und damit 2 Wochen länger als im aktuellen Versuch. Neben der Nachweismethode könnte daher auch eine weitere Erklärung darin liegen, dass ein dauerhafter Anstieg der Superoxidlevel *in vivo* eine bestimmte Dauer der Behandlung voraussetzt [33]. So fanden sich beispielsweise nach einer 2 wöchigen Behandlung mit Aldosteron noch keine signifikant erhöhten Superoxidlevel in den Gefäßwänden von Versuchstieren [167]. Im Nierengewebe von Ratten, welche mit DOCA und Salz behandelt wurden, fanden sich auch nach einer Behandlungsdauer von 3 Wochen noch keine signifikanten Unterschiede in der Superoxidproduktion [168]. Diese ließen sich zwar nach 4 Wochen nachweisen, doch zeigt dies, dass der Nachweis von gesteigerten ROS-Leveln *in vivo* von der Versuchsdauer abhängt und möglicherweise eine längere Versuchsanordnung hier eindeutiger Resultate gezeigt hätte.

5.3 Antioxidative Abwehr

Um sich vor oxidativem Stress zu schützen, verfügt die tierische wie die menschliche Zelle über eine ausgeprägte antioxidative Abwehr, welche sich zum einen aus antioxidativen Metaboliten wie Ascorbinsäure und zum anderen aus einer enzymatischen antioxidativen Abwehr zusammensetzt. Wichtige antioxidative Enzyme sind dabei SOD1, HO-1 oder das Glutathion- und das Thioredoxin-System. Die Expression dieser Enzyme wird maßgeblich durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 gesteuert.

Nachdem wir zeigen konnten, dass Aldosteron zu einer Zunahme von oxidativem Stress im Nierengewebe führt, sollte im nächsten Schritt die Auswirkung auf die

antioxidative Abwehr analysiert werden. Zunächst wurde dabei die Auswirkung auf den Transkriptionsfaktor Nrf2 analysiert. Im Anschluss daran wurde auf Proteinebene die Auswirkung auf die Synthese antioxidativer Enzyme am Beispiel von SOD, HO-1, GCLC und TRX verglichen. Anschließend beurteilten wir durch die Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen die Effektivität des antioxidativen Schutzes in den unterschiedlichen Gruppen.

5.3.1 Aldosteron führt zur Aktivierung von Nrf2

Der Transkriptionsfaktor Nrf2 wird als zentraler Regulator der antioxidativen Abwehr angesehen [100]. In Ruhe liegt er inaktiv, gebunden an Keap1, im Zytosol vor. Bei steigendem oxidativem Stress kommt es durch freie Radikale zu einer Änderung von Cysteinresten an Keap1 und die Bindung löst sich. Auch durch eine Phosphorylierung von Nrf2 durch die PKC kann Nrf2 in seine aktive, gelöste Form übergehen. Freigewordenes Nrf2 disloziert in den Zellkern, um dort an das ARE zu binden und die Synthese antioxidativer Enzyme zu initiieren.

In unserem Versuch wiesen wir im Zellkern vorhandenes „aktives“ Nrf2 mittels immunhistochemischer Färbung nach. Die Anzahl der Nrf2-positiven Zellkerne wurde für Mark und Rinde getrennt bestimmt und unter den Gruppen verglichen. Aldosteron führte in den Versuchstieren sowohl im Nierenmark als auch in der Nierenrinde zu einem deutlichen Anstieg der Nrf2-Aktivierung. *In vitro* konnten wir bereits beobachten, dass 30 min nach einer Inkubation mit Aldosteron die Nrf2-DNA Bindung signifikant erhöht war. Allerdings fiel diese auch rasch (18 h bzw. 24 h nach Inkubation) wieder auf Normalniveau ab [130]. Die nun gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass ein chronischer Hyperaldosteronismus *in vivo* zu einer dauerhaft erhöhten Nrf2-Aktivierung führt. Die Tiere, welche Spironolacton und Aldosteron erhalten haben, zeigten keinen Anstieg Nrf2-positiver Zellkerne. Das macht deutlich, dass diese Aktivierung über den MR vermittelt wird. Auch die Blockade von Nox oder NOS mittels Apocynin bzw. L-NAME führte dazu, dass in diesen Interventionsgruppen der Nrf2-Anstieg signifikant reduziert wurde und die Nrf2-positiven Zellkerne weitgehend auf dem Niveau der Kontrollgruppe blieben. Von besonderem Interesse war dabei, dass

der Blutdruck in der L-NAME-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle als auch zur Aldosterongruppe signifikant gesteigert war. Die Nrf2-Aktivierung in der Aldosterongruppe scheint daher unabhängig von dem im Vergleich zur Kontrolle gesteigertem Blutdruck zu erfolgen. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass der durch Aldosteron zu verzeichnende Nrf2-Anstieg durch oxidativen bzw. nitrosativen Stress verursacht wird, welcher maßgeblich durch eine MR-vermittelte Aktivierung von Nox und NOS entsteht. Diese Beobachtung deckt sich mit Erkenntnissen aus vorherigen Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass Aldosteron über den MR calciumabhängig und mit Hilfe der PKC zu einer Aktivierung von Nox und NOS und letztlich zum Anstieg von oxidativem Stress führt [124]. Wie bereits erwähnt, kann Nrf2 durch die PKC auch direkt aktiviert werden. *In vitro* konnte unsere Arbeitsgruppe beobachten, dass bei einer Inkubation von Tubuluszellen (LLC-PK1) mit Aldosteron eine zeitgleiche Blockade der PKC zu einer signifikanten Reduktion des Nrf2-Anstiegs führte, die Nrf2-Werte jedoch im Vergleich zur Kontrolle weiterhin erhöht waren und der Effekt hinter dem einer direkten Blockade der Nox zurückblieb [130]. Ebenfalls konnten wir *in vivo* beobachten, dass durch die Gabe des Antioxidans Tempol in Versuchstieren mit Hyperaldosteronismus ein Nrf2-Anstieg verhindert wurde [130]. Zusammenfassend zeigt dies, dass der beobachtete Nrf2-Anstieg maßgeblich durch den Anstieg von oxidativem Stress verursacht wird.

Die Versuchsgruppe, welche neben Aldosteron PDTC erhalten hatte, zeigte ebenfalls keinen Anstieg der Nrf2-positiven Zellkerne. Wie bereits unter 5.2 ausgeführt, reguliert NF- κ B die Expression pro-oxidativer Enzyme wie z.B. Nox und NOS. Der ausbleibende Nrf2-Anstieg war konkordant zu den niedrigen ROS-Leveln der PDTC/Aldosteron-Gruppe. Dies bestärkt die Annahme, dass dem NF- κ B Signalweg eine wichtige Rolle bei der Entstehung oxidativen Stresses durch Aldosteron zukommt. Verwunderlich ist dabei, dass *in vitro* durch PDTC in Astrozyten eine Aktivierung des Nrf2 Signalweges beobachtet werden konnte [169], in unserem Versuch eine Nrf2-Aktivierung durch die Gabe von PDTC jedoch verhindert wurde. Eine mögliche Erklärung wäre, dass PDTC in unterschiedlichen Organsystemen bzw. *in vivo* unterschiedliche Wirkung entfaltet oder aber, dass z.B. der durch PDTC zu erwartende Nrf2-Anstieg deutlich hinter

dem durch Aldosteron verursachten Nrf2-Anstieg zurückbleibt, so dass in unserem Versuch die antioxidativen Eigenschaften von PDTC überwogen.

Sulforaphan ist ein sekundärer Pflanzenstoff, der insbesondere in Kreuzblütengewächsen wie Kohl und Brokkoli vorkommt. Es ist ein natürlicher Nrf2-Induktor und führte in unserem Versuch im Nierengewebe der Versuchstiere verlässlich zu einer deutlich gesteigerten Nrf2-Aktivierung. Sulforaphan war in der Lage, die durch Aldosteron verursachte Nrf2-Aktivierung weiter zu steigern, sodass die Tiere, welche Sulforaphan und Aldosteron bekamen, die höchste Anzahl Nrf2-positiver Kerne sowohl im Kortex als auch im Mark aufwiesen. Dabei war die Anzahl nur knapp über denen der Gruppe, welche alleinig Sulforaphan bekommen hatte, und eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Aldosterongruppe konnte nicht gezeigt werden. Erklären ließe sich dies beispielsweise dadurch, dass die Aktivierung von Nrf2 gegen einen Sättigungswert läuft bzw. ab einem bestimmten Wert eine Steigerung nur noch schwer möglich ist, aber auch eine Interaktion zwischen Sulforaphan und Aldosteron könnte eine Erklärung sein.

5.3.2 Auswirkung auf die Synthese antioxidativer Enzyme

Nachdem wir zeigen konnten, dass erhöhte Aldosteronspiegel in den Tieren zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 führte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob diese Aktivierung auch auf Proteinebene eine verstärkte Synthese antioxidativer Enzyme veranlasste. Dazu wurden die Level von SOD1, GCLC, TrxR1 und HO-1 mittels Westernblot bestimmt und mit der Kontroll- bzw. Aldosterongruppe verglichen. Trotz der erhöhten Nrf2-Aktivität, ließ sich für Aldosteron keine gesteigerte Synthese dieser antioxidativen Enzyme nachweisen. *In vitro* konnte unsere Arbeitsgruppe in Nierenzellen zeigen, dass nach einer Behandlung mit Aldosteron ein Anstieg der Nrf2-DNA-Bindung erfolgte und dieser mit einer signifikant gesteigerten Synthese von SOD1, GCLC, TrxR1 und HO-1 verbunden war. Dieser Anstieg war zeitlich begrenzt und 24 h nach der Aldosteronbehandlung nicht mehr nachweisbar, wobei auch die Nrf2-Aktivität auf Kontrollniveau zurückgefallen war [130]. Eine mögliche Erklärung für

den Unterschied könnte im Zeitraum der Aldosteroneinwirkung liegen. *In vivo* waren die Tiere 4 Wochen erhöhten Aldosteronspiegeln ausgesetzt. Möglicherweise wird bei einem chronischen Stimulus trotz der vermehrten Nrf2-Aktivität im Zellkern die Synthese Nrf2-abhängiger Gene ab einem gewissen Zeitpunkt herunterreguliert. So wurde beispielsweise im Tiermodell für chronische Niereninsuffizienz trotz vermehrtem oxidativem Stress eine Herabregulierung Nrf2-abhängiger Gene im Nierengewebe gezeigt [170, 171]. Auch spontan hypertensive Ratten zeigten im Nierengewebe – trotz der Zunahme von oxidativem Stress – eine Abnahme von Thioredoxin [172] bzw. SOD [173]. Eine weitere mögliche Ursache könnte darin liegen, dass für die Proteinuntersuchung nicht zwischen Mark und Kortex unterschieden, sondern vielmehr ein Teil der gesamten Niere verwendet wurde. Unklar ist auch, ob das im Kern nachgewiesene Nrf2 tatsächlich an die ARE-Promoterregion gebunden war. Innerhalb des Nukleus sind noch mehrere Schritte notwendig, um eine Bindung von Nrf2 an ARE zu erreichen wie z.B. die Entfernung der inhibitorischen Proteine Bach1 oder Fyn aus dem Zellkern [174]. Zudem kann Nrf2 auch innerhalb des Nukleus inaktiviert werden [175]. Daher könnte trotz einer Translokation von Nrf2 in den Nukleus eine Bindung an ARE und damit die Synthese antioxidativer Enzyme unterbleiben.

Lediglich in der Sulforaphan-Gruppe fand sich eine regelhafte Steigerung der Level antioxidativer Proteine, wobei dieser Effekt keine statistische Signifikanz erreichte und bei einer Kombination von Aldosteron und Sulforaphan für keines der Proteine mehr nachweisbar war. Vielmehr entsprachen die nachgewiesenen Proteinlevel der Sulforaphan/Aldosteron-Gruppe denen der Aldosteron-Gruppe. Die Aktivierung von Nrf2 durch Sulforaphan wird über eine Modulation von Cysteinresten an Keap1 vermittelt [176]. Der genaue Mechanismus ist noch unklar, doch eine mögliche Erklärung, warum in unserem Versuch die Sulforaphan vermittelte Aktivierung von antioxidativen Enzymen in der Sulforaphan/Aldosteron-Gruppe ausblieb, könnte darin liegen, dass Sulforaphan durch die Reaktion mit freien Radikalen in seiner Funktion als Nrf2-Aktivator eingeschränkt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Sulforaphan auch als Radikalfänger fungiert und eine ähnlich antioxidative Wirkung wie Vitamin C

besitzt. Diese ist dosisabhängig und wird in den Wasserstoffatomen seiner Isothiocyanate- bzw. Sulfoxidgruppen vermutet, welche mit den freien Radikalen reagieren [177]. Die durch Aldosteron vermehrt anfallenden Radikale könnten daher für eine Veränderung von Sulforaphan gesorgt haben, wodurch dieses seine Fähigkeit der Nrf2-Induktion teilweise verloren hat.

Den einzig signifikanten Anstieg antioxidativer Enzyme konnten wir für HO-1 durch L-NAME und PDTC beobachten. In diesen Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg für HO-1 im Vergleich zur Aldosterongruppe. Dieser Anstieg ist verwunderlich, da die Nrf2-Aktivität in diesen beiden Gruppen weitgehend auf Kontrollniveau blieb. Eine mögliche Erklärung könnte in der Sonderstellung von HO-1 liegen; so kann dessen Synthese durch mehrere Transkriptionsfaktoren gesteuert werden [178]. Dafür spricht auch, dass L-NAME und PDTC keinen vergleichbaren Effekt auf die Synthese weiterer antioxidativer Enzymen hatten.

5.3.3 Genomschädigende Wirkung von Aldosteron trotz Aktivierung von Nrf2 – Effektiver Schutz durch Sulforaphan

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass erhöhte Aldosteronlevel im Nierengewebe zu oxidativem Stress und zu einer Schädigung des Erbgutes innerhalb der Zelle führten [129, 141, 179]. Ein möglicher Schutz vor diesem genotoxischen Effekt könnte in der Aktivierung des Nrf2-Signalweges liegen. Nachdem wir zeigen konnten, dass Aldosteron zu einer Aktivierung von Nrf2 führt, sollte analysiert werden, ob diese Aktivierung ausreicht, um die Zellen vor der genomschädigenden Wirkung von Aldosteron zu schützen bzw. gezeigt werden, welche Intervention den besten Schutz davor bietet. Dazu wurde das Nierengewebe der Tiere mittels immunhistochemischer Färbung bezüglich des Vorliegens von Doppelstrangbrüchen der DNA untersucht und mit der Kontrolle bzw. der Aldosterongruppe verglichen. Doppelstrangbrüche gehören zu den ernsthaftesten DNA-Schäden. Sie können zur Apoptose oder bei fehlerhafter Reparatur zur genomischen Instabilität und Entartung einer Zelle führen [180]. Ein gehäuftes Auftreten dieser genomischen Schäden könnte mitursächlich für die gehäufte Malignominzidenz in Patienten mit erhöhten Aldosteronleveln sein.

Trotz gesteigerter Nrf2-Aktivität zeigte die Aldosterongruppe einen deutlichen Anstieg der DNA-Schäden sowohl im Nierenmark, als auch in der Nierenrinde. Die Steigerung der zelleigenen antioxidativen Abwehr durch den Nrf2-Anstieg reichte folglich nicht aus, um das Gewebe dauerhaft vor den Nebenwirkungen eines erhöhten Aldosteronspiegels zu schützen. Dieses Ergebnis entspricht auch den von uns *in vitro* gemachten Beobachtungen. Hierbei kam es in kultivierten Tubuluszellen 4 h nach einer Inkubation mit Aldosteron trotz einer gesteigerten Nrf2-DNA-Bindung zu einem signifikanten Anstieg von Doppelstrangbrüchen, welche im weiteren zeitlichen Verlauf noch weiter zunahmten [130]. Für das Auftreten von Genomschäden zeigte die Intervention mit Sulforaphan und die Intervention mit Spironolacton den stärksten protektiven Effekt. Beide führten zu der niedrigsten Anzahl an Doppelstrangbrüchen innerhalb der Interventionen. Zu beachten ist, dass Spironolacton zu einer signifikanten Reduktion des Blutdrucks im Vergleich zu Aldosteron führte. Die Werte lagen in dieser Gruppe auf dem Niveau der Kontrolle. Auch in der Sulforaphangruppe lag der Mittelwert des systolischen Blutdrucks etwa 20 mmHg unter dem der Aldosterongruppe. Allerdings zeigte die L-NAME-Gruppe eine signifikante Reduktion von Doppelstrangbrüchen im Vergleich zur Aldosterongruppe, trotz deutlich höherer Blutdruckwerte im Vergleich zur Aldosterongruppe. Der Blutdruck scheint daher keinen maßgeblichen Einfluss auf den beobachteten genotoxischen Effekt von Aldosteron bzw. den protektiven Effekt in den Interventionsgruppen zu haben. Unter den Interventionsgruppen war die Sulforaphan/Aldosterongruppe die einzige Gruppe mit einem Anstieg Nrf2-positiver Zellen. Sie zeigte die stärkste Nrf2-Aktivierung in unserem Versuch. Eine Chemoprävention mittels Sulforaphan wird derzeit für zahlreiche Krebsarten, wie z.B. Blasen- [181] Brust- [182] oder Kolorektalkarzinome [183], untersucht. Der maßgebliche Wirkmechanismus von Sulforaphan wird dabei über eine Steigerung der endogenen antioxidativen Abwehr über den Nrf2-Signalweg vermutet [184]. Wir konnten zeigen, dass Aldosteron selbst zu einer Nrf2-Aktivierung führt, wobei diese nicht ausreichte, um die genomschädliche Wirkung von Aldosteron zu verhindern. Die Behandlung mit Sulforaphan führte zwar zu einer zusätzlichen Steigerung der Nrf2-Aktivierung, jedoch war diese Steigerung nicht signifikant gegenüber der

Aldosterongruppe. Ob dieser Anstieg der Nrf2-Aktivierung ausreicht, um die deutlich reduzierten DNA-Schäden in der Sulforaphan/Aldosteron-Gruppe zu erklären, scheint fragwürdig. Vielmehr scheint es, dass Sulforaphan neben der Nrf2-Aktivierung noch über andere Mechanismen seine protektive Wirkung entfaltet. Beispielsweise führt Sulforaphan auch zu einer Inaktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B [185]. NF- κ B wird unter anderem als Reaktion auf oxidativen Stress aktiviert und führt beispielsweise zu Immunreaktionen, Entzündung, Proliferation, Zelltod oder dem Überleben geschädigter Zellen [117]. NF- κ B hat allerdings auch pro-oxidative Zielgene; so führt er z.B. zu einer Induktion von Nox2 (gp91phox) [162] oder iNOS [163]. Der Zusammenhang zwischen vermehrtem Vorkommen von ROS und einer gesteigerten NF- κ B Aktivierung ist folglich in beide Richtungen möglich [155]. Dies bietet auch eine Erklärung dafür, dass eine Blockade von NF- κ B mittels PDMC in unserem Versuch zu einem Abfall der ROS-Level und reduzierten Genomschäden führte. Eine weitere mögliche Erklärung der protektiven Wirkung von Sulforaphan könnte darin liegen, dass es neben seiner Funktion als indirektes Antioxidans als Nrf2-Induktor auch einen direkten antioxidativen Effekt ausübt. Sulforaphan ist in der Lage, ähnlich einem Cofaktor die Umwandlung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid durch die SOD zu unterstützen [186]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Sulforaphan eine ähnliche antioxidative Wirkung wie das direkte Antioxidans Vitamin C besitzt [177]. Diese Wirkung von Sulforaphan ist dosisabhängig und wird in den Wasserstoffatomen seiner Isothiocyanate- bzw. Sulfoxidgruppen vermutet. Die protektive Wirkung von Sulforaphan könnte daher neben einer Nrf2-Induktion auch durch eine direkte Interaktion mit freien Radikalen erfolgt sein.

Die übrigen Interventionsgruppen übten ohne erhöhte Nrf2-Aktivität dennoch einen effektiven Schutz vor der genotoxischen Wirkung durch Aldosteron aus. Unsere Arbeitsgruppe konnte zuvor zeigen, dass diese genomschädigende Wirkung maßgeblich durch einen Anstieg von oxidativem Stress verursacht und über den MR vermittelt wird [128, 141], wobei *in vitro* nachgewiesen werden konnte, dass es zu einer Aktivierung von Nox und NOS kommt, welche den Anstieg freier Radikale verursachen [124]. Die Intervention mit Spironolacton

bewirkte sowohl im Mark als auch im Kortex die stärkste Reduktion der durch Aldosteron verursachten DNA-Schäden. Eine Blockade der Nox mit Apocynin bzw. der NOS mit L-NAME sowie die Intervention mit PDTC konnten ebenfalls das Auftreten von Genomschäden signifikant reduzieren. Allerdings greifen diese Interventionen später bzw. nur gezielt in die Signalkaskade ein. Apocynin verhindert durch eine Blockade der Untereinheit gp47phox und gp67phox die Aktivierung des Nox-Enzymkomplexes [79], jedoch sind diese Untereinheiten beispielsweise für die Aktivität der ebenfalls in der Niere vorkommenden Nox4 nicht notwendig [88], wodurch eine eingeschränkte Schutzwirkung dieser gezielten Intervention bedingt werden könnte. Bedenkt man, dass die Aktivierung des MR zu Beginn einer potentiell schädlichen Signalkaskade steht, erscheint es nur folgerichtig, anzunehmen, dass ein möglichst frühes Eingreifen in das Entstehen des oxidativen Stresses den effektivsten Schutz bietet.

6 Zusammenfassung

Patienten mit erhöhten Aldosteronspiegeln zeigen eine gesteigerte Inzidenz für Malignome, insbesondere von Nierenzellkarzinomen. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Aldosteron-vermittelte oxidative Nierenschädigung näher zu analysieren sowie die auf Zellebene gezeigte Beeinflussung der antioxidativen Schutzmechanismen im lebenden Organismus nachzuweisen und mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Dazu wurde ein Interventionsversuch über 28 Tage durchgeführt. Neben einer Aldosterongabe wurden folgende Interventionen verwendet: Spironolacton zur Blockade des Mineralkortikoid-Rezeptors (MR), Apocynin als Hemmstoff der NADPH-Oxidasen (Nox), L-NAME zur Blockade der NO-Synthasen (NOS), PDTC, einen Hemmstoff des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie Sulforaphan, ein natürlicher Nrf2-Induktor. Eine weitere Gruppe erhielt Sulforaphan ohne additive Aldosterongabe. Die Nierenschäden wurden mittels histopathologischer Schädigungsscores und der Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüche analysiert. Die Beeinflussung der antioxidativen Abwehr wurde durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 und durch die Quantifizierung antioxidativer Enzyme bestimmt.

Im Nierengewebe führte Aldosteron zu einer Zunahme von oxidativem Stress. Histologisch zeigte sich ein Anstieg von glomerulären Schäden. Auch kam es zu einer deutlichen Zunahme von Doppelstrangbrüchen der DNA. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass Aldosteron auch *in vivo* zu einer Zunahme der Nrf2-Aktivität führte, wobei sich dies auf Proteinebene nicht in einer (dauerhaften) Synthesesteigerung von antioxidativen Enzymen widerspiegelte und keinen ausreichenden Schutz des Nierengewebes bot. Für die Interventionsgruppen konnte keine signifikante Auswirkung auf das Vorliegen von oxidativem Stress gezeigt werden. Dies könnte an der Versuchsdauer bzw. an der gewählten Nachweismethode gelegen haben. Nichtsdestotrotz zeigte die Blockade der Nox durch Apocynin bzw. der NOS durch L-NAME eine effektive Reduktion der histologischen und genomischen Schäden. Die L-NAME-Gruppe wies dabei die höchsten Blutdruckwerte auf, diese waren auch zur Aldosterongruppe signifikant

gesteigert. Die beobachteten Effekte waren folglich nicht durch den in der Aldosterongruppe erfolgten Blutdruckanstieg, sondern vielmehr durch den Anstieg von oxidativem Stress zu erklären. Ebenfalls blieb die Nrf2-Aktivität bei der Gabe von Apocynin und L-NAME weitgehend auf Kontrollniveau, was dafürspricht, dass der in der Aldosterongruppe messbare Nrf2-Anstieg am ehesten als Reaktion auf chronisch erhöhten oxidativen Stress erfolgte, welcher durch die Interventionen ausblieb. Die Blockade von NF- κ B mittels PDTC führte zu vergleichbaren Effekten wie Apocynin und L-NAME. Das deutet darauf hin, dass Aldosteron über die Aktivierung von NF- κ B die vermehrte Synthese von pro-oxidativen Enzymen wie Nox und NOS anregt. Die Gabe von Spironolacton hatte den stärksten protektiven Effekt, sowohl auf histologische Veränderungen als auch auf das Entstehen von DNA-Doppelstrangbrüchen, wobei die Nrf2-Aktivität in dieser Gruppe ebenfalls auf Kontrollniveau blieb. Die Aldosteroneffekte wurden folglich über den MR vermittelt. Eine additive Nrf2-Induktion mittels Sulforaphan konnte auch keinen (dauerhaften) Effekt auf die Synthese antioxidativer Enzyme zeigen. Dennoch zeigte diese Gruppe einen ähnlich effektiven Schutz vor den oxidativen Nierenschäden wie die Gabe von Spironolacton. Vieles spricht dafür, dass die Wirkung von Sulforaphan dabei über seine Wirkung als direktes Antioxidans bzw. Radikalfänger und nicht über den Nrf2-Weg zu erklären ist.

Aldosteron führt in der Niere über oxidativen Stress zu glomerulärer Fibrose und DNA-Schäden. Das könnte eine Erklärung für die gesteigerte Inzidenz von Nierenzellkarzinomen in Patienten mit erhöhten Aldosteronspiegeln darstellen. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass Aldosteron über eine Signalkaskade über den MR zu einer Aktivierung von Nox und NOS führt. Der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B scheint dabei durch die Synthese pro-oxidativer Enzyme eine Art Verstärker-Effekt zuzukommen. Als Reaktion auf den durch Aldosteron gesteigerten oxidativen Stress kommt es zu einer Aktivierung des antioxidativen Transkriptionsfaktors Nrf2, jedoch ohne dass dies zu einem ausreichenden Schutz des Nierengewebes führt. Mögliche therapeutische Ansatzpunkte für einen Schutz vor den durch Aldosteron vermittelten oxidativen Nierenschäden scheinen eher innerhalb der Aldosteronsignalkaskade, insbesondere in der Blockade des MR, als in der antioxidativen Abwehr zu liegen.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACTH	Adrenocorticotropin
ANOVA	Varianzanalyse
ARE	antioxidant response element
BVR	Biliverdin-Reduktase
bZIP	basic leucine zipper-Protein
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	Katalase
CO	Kohlenstoffmonoxid
DAB	3´3´-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
DHE	Dihydroethidium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ENaC	epithelialer Natriumkanal
EPHESUS	Eplerenone Post–Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study
ERK	Extracellular signal–regulated-Kinase
EtOH	Ethanol
GCL	Glutamatcysteinligase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSI	Glomeruloskleroseindex
GSS	Glutathionsynthetase
GST	Glutathion-S-Transferase

Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HClO	Hypochlorige Säure
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	Meerrettichperoxidase
IP3	Inositoltriphosphat
K ⁺	Kalium
Keap1	Kelch like-ECH-associated protein 1
L-NAME	L-Nitroargininmethylester
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein Kinase
MeOH	Methanol
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MSI	Mesangiolyseindex
Na ⁺	Natrium
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NF-E2	Nuclear-factor-erythroid-2
NO	Stickstoffmonoxid
Nox	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidasen
NQO1	NAD(P)H:quinon-Dehydrogenase-1
Nrf2	Nuclear-factor-erythroid-2-related-factor-2
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
O ₃	Ozon
OH ⁻	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i> , Periodsäure-Schiff
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung)
PDTC	Pyrrolidin dithiocarbamat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C

Abkürzungsverzeichnis

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	Renal Outer Medullary K ⁺ channel
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SOD	Superoxiddismutase
Tritc	Tetramethylrhodamins
TrxR	Thioredoxinreduktase
TSI	Tubulointerstitieller Schädigungsindex
VSI	Vaskulärer Schädigungsindex

8 Literaturverzeichnis

1. WHO, *Raised blood pressure*. 2015: Global Health Observatory (GHO) data.
2. Lim, S.S., et al., *A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2224-60.
3. Dyer, A.R., et al., *High blood-pressure: a risk factor for cancer mortality?* Lancet, 1975. **1**(7915): p. 1051-6.
4. Grove, J.S., et al., *The association of blood pressure with cancer incidence in a prospective study*. Am J Epidemiol, 1991. **134**(9): p. 942-7.
5. McCredie, M. and J.H. Stewart, *Risk factors for kidney cancer in New South Wales, Australia. II. Urologic disease, hypertension, obesity, and hormonal factors*. Cancer Causes Control, 1992. **3**(4): p. 323-31.
6. Maatela, J., et al., *The risk of endometrial cancer in diabetic and hypertensive patients: a nationwide record-linkage study in Finland*. Ann Chir Gynaecol Suppl, 1994. **208**: p. 20-4.
7. Grossman, E., et al., *Is there an association between hypertension and cancer mortality?* Am J Med, 2002. **112**(6): p. 479-86.
8. Radisauskas, R., et al., *Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence*. Medicina (Kaunas), 2016. **52**(2): p. 89-98.
9. Colt, J.S., et al., *Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans*. Epidemiology, 2011. **22**(6): p. 797-804.
10. Buck, C. and A. Donner, *Cancer incidence in hypertensives*. Cancer, 1987. **59**(7): p. 1386-90.
11. Lee, M.R., *Renin-secreting kidney tumours. A rare but remediable cause of serious hypertension*. Lancet, 1971. **2**(7718): p. 254-5.
12. Stocks, T., et al., *Metabolic factors and the risk of colorectal cancer in 580,000 men and women in the metabolic syndrome and cancer project (Me-Can)*. Cancer, 2011. **117**(11): p. 2398-407.
13. Nagel, G., et al., *Metabolic risk factors and skin cancer in the Metabolic Syndrome and Cancer Project (Me-Can)*. Br J Dermatol, 2012. **167**(1): p. 59-67.
14. Bjorge, T., et al., *Metabolic syndrome and endometrial carcinoma*. Am J Epidemiol, 2010. **171**(8): p. 892-902.
15. Weinmann, S., et al., *Use of diuretics and other antihypertensive medications in relation to the risk of renal cell cancer*. Am J Epidemiol, 1994. **140**(9): p. 792-804.
16. Messerli, F.H., *Risk factors for renal cell carcinoma: hypertension or diuretics?* Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 774-5.
17. Fryzek, J.P., et al., *A cohort study of antihypertensive treatments and risk of renal cell cancer*. Br J Cancer, 2005. **92**(7): p. 1302-6.

18. Coleman, C.I., et al., *Antihypertensive medication and their impact on cancer incidence: a mixed treatment comparison meta-analysis of randomized controlled trials*. J Hypertens, 2008. **26**(4): p. 622-9.
19. Shapiro, J.A., et al., *Hypertension, antihypertensive medication use, and risk of renal cell carcinoma*. Am J Epidemiol, 1999. **149**(6): p. 521-30.
20. Colt, J.S., et al., *Antihypertensive medication use and risk of renal cell carcinoma*. Cancer Causes Control, 2017. **28**(4): p. 289-297.
21. Hamet, P., *Cancer and hypertension. An unresolved issue*. Hypertension, 1996. **28**(3): p. 321-4.
22. Meyer, P., *Increased intracellular calcium: from hypertension to cancer*. J Hypertens Suppl, 1987. **5**(4): p. S3-4.
23. George, A.J., W.G. Thomas, and R.D. Hannan, *The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(11): p. 745-59.
24. Deckers, I.A., et al., *Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. 1104-16.
25. King, S., et al., *Evidence for aldosterone-dependent growth of renal cell carcinoma*. Int J Exp Pathol, 2014. **95**(4): p. 244-50.
26. Lang, K., et al., *Prevalence of Malignancies in Patients With Primary Aldosteronism*. J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(4): p. 1656-63.
27. Simpson, S.A., et al., *[Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism]*. Experientia, 1953. **9**(9): p. 333-5.
28. MacKenzie, S.M., J.M. Connell, and E. Davies, *Non-adrenal synthesis of aldosterone: a reality check*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 163-7.
29. Bruner, K.L., et al., *The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52*. Recept Signal Transduct, 1997. **7**(2): p. 85-98.
30. Connell, J.M. and E. Davies, *The new biology of aldosterone*. J Endocrinol, 2005. **186**(1): p. 1-20.
31. Falkenstein, E., A.W. Norman, and M. Wehling, *Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s)*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(5): p. 2072-5.
32. May, A., et al., *Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel alpha subunit in A6 renal cells*. J Am Soc Nephrol, 1997. **8**(12): p. 1813-22.
33. Queisser, N. and N. Schupp, *Aldosterone, oxidative stress, and NF-kappaB activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(2): p. 314-27.
34. Wehling, M., et al., *Rapid cardiovascular action of aldosterone in man*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(10): p. 3517-22.
35. Grossmann, C. and M. Gekle, *New aspects of rapid aldosterone signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **308**(1-2): p. 53-62.
36. Wehling, M., *Rapid actions of aldosterone revisited: Receptors in the limelight*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017.

37. Ruhs, S., et al., *30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor*. J Endocrinol, 2017. **234**(1): p. T107-T124.
38. Grossmann, C., et al., *Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(7): p. 1697-710.
39. Christ, M., et al., *Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells*. Circulation, 1999. **99**(11): p. 1485-91.
40. Christ, M., et al., *Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **213**(1): p. 123-9.
41. Wehling, M., et al., *Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 973-9.
42. McEneaney, V., B.J. Harvey, and W. Thomas, *Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2007. **107**(3-5): p. 180-90.
43. Good, D.W., *Nongenomic actions of aldosterone on the renal tubule*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 728-39.
44. Calhoun, D.A., et al., *Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research*. Circulation, 2008. **117**(25): p. e510-26.
45. Rossi, G.P., et al., *A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2293-300.
46. Olivieri, O., et al., *Aldosterone to Renin ratio in a primary care setting: the Bussolengo study*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(9): p. 4221-6.
47. Weber, K.T., *Aldosterone in congestive heart failure*. N Engl J Med, 2001. **345**(23): p. 1689-97.
48. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
49. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
50. Lea, W.B., et al., *Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt*. Kidney Int, 2009. **75**(9): p. 936-44.
51. Quinkler, M., et al., *Increased expression of mineralocorticoid effector mechanisms in kidney biopsies of patients with heavy proteinuria*. Circulation, 2005. **112**(10): p. 1435-43.
52. Nishiyama, A., et al., *Drug discovery for overcoming chronic kidney disease (CKD): pharmacological effects of mineralocorticoid-receptor blockers*. J Pharmacol Sci, 2009. **109**(1): p. 1-6.

53. Bianchi, S., R. Bigazzi, and V.M. Campese, *Antagonists of aldosterone and proteinuria in patients with CKD: an uncontrolled pilot study*. Am J Kidney Dis, 2005. **46**(1): p. 45-51.
54. Xue, C. and H.M. Siragy, *Local renal aldosterone system and its regulation by salt, diabetes, and angiotensin II type 1 receptor*. Hypertension, 2005. **46**(3): p. 584-90.
55. Del Vecchio, L., et al., *Mechanisms of disease: The role of aldosterone in kidney damage and clinical benefits of its blockade*. Nat Clin Pract Nephrol, 2007. **3**(1): p. 42-9.
56. Cernaro, V., et al., *Fibrosis, regeneration and cancer: what is the link?* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(1): p. 21-7.
57. Kotlyar, E., et al., *The relationship between aldosterone, oxidative stress, and inflammation in chronic, stable human heart failure*. J Card Fail, 2006. **12**(2): p. 122-7.
58. Skott, O., et al., *Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease--friend or foe?* Pharmacol Ther, 2006. **111**(2): p. 495-507.
59. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
60. McCord, J.M. and I. Fridovich, *The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase*. J Biol Chem, 1968. **243**(21): p. 5753-60.
61. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
62. McCord, J.M., *Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase*. Science, 1974. **185**(4150): p. 529-31.
63. Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte, *Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent*. J Clin Invest, 1973. **52**(3): p. 741-4.
64. Halliwell, B., *Oxidative stress and cancer: have we moved forward?* Biochem J, 2007. **401**(1): p. 1-11.
65. Gius, D. and D.R. Spitz, *Redox signaling in cancer biology*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(7-8): p. 1249-52.
66. Singh, N., et al., *Oxidative stress and heart failure*. Mol Cell Biochem, 1995. **147**(1-2): p. 77-81.
67. Yang, H., et al., *Oxidative stress and diabetes mellitus*. Clin Chem Lab Med, 2011. **49**(11): p. 1773-82.
68. Stopper, H., et al., *Genomic damage in chronic renal failure--potential therapeutic interventions*. J Ren Nutr, 2005. **15**(1): p. 81-6.
69. Hwang, O., *Role of oxidative stress in Parkinson's disease*. Exp Neurobiol, 2013. **22**(1): p. 11-7.
70. Black, C.N., et al., *Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis*. Psychoneuroendocrinology, 2015. **51**: p. 164-75.
71. Emiliani, F.E., T.W. Sedlak, and A. Sawa, *Oxidative stress and schizophrenia: recent breakthroughs from an old story*. Curr Opin Psychiatry, 2014. **27**(3): p. 185-90.
72. Lobo, V., et al., *Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health*. Pharmacogn Rev, 2010. **4**(8): p. 118-26.

73. D'Autreaux, B. and M.B. Toledano, *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 813-24.
74. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
75. Kardeh, S., S. Ashkani-Esfahani, and A.M. Alizadeh, *Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer*. Eur J Pharmacol, 2014. **735**: p. 150-68.
76. Stuehr, D.J., *Mammalian nitric oxide synthases*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 217-30.
77. Szabo, C., H. Ischiropoulos, and R. Radi, *Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 662-80.
78. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
79. Bedard, K. and K.H. Krause, *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
80. Babior, B.M., J.T. Curnutte, and B.S. Kipnes, *Pyridine nucleotide-dependent superoxide production by a cell-free system from human granulocytes*. J Clin Invest, 1975. **56**(4): p. 1035-42.
81. Parkos, C.A., et al., *Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000*. J Clin Invest, 1987. **80**(3): p. 732-42.
82. Diebold, B.A. and G.M. Bokoch, *Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 211-5.
83. Koga, H., et al., *Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25051-60.
84. Griendling, K.K., *NADPH oxidases: new regulators of old functions*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1443-5.
85. Paravicini, T.M. and R.M. Touyz, *NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities*. Diabetes Care, 2008. **31 Suppl 2**: p. S170-80.
86. Lassegue, B. and K.K. Griendling, *NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 653-61.
87. Geiszt, M., et al., *Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 8010-4.
88. Martyn, K.D., et al., *Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases*. Cell Signal, 2006. **18**(1): p. 69-82.
89. Holterman, C.E., N.C. Read, and C.R. Kennedy, *Nox and renal disease*. Clin Sci (Lond), 2015. **128**(8): p. 465-81.
90. Zhu, X., et al., *Aldosterone stimulates superoxide production in macula densa cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(3): p. F529-35.
91. Iwashima, F., et al., *Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1009-14.

92. Kone, B.C., *Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health*. Semin Nephrol, 2004. **24**(4): p. 299-315.
93. Tang, L., H. Wang, and M.T. Ziolo, *Targeting NOS as a therapeutic approach for heart failure*. Pharmacol Ther, 2014. **142**(3): p. 306-15.
94. Kaibori, M., et al., *Immunosuppressant FK506 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression at a step of NF-kappaB activation in rat hepatocytes*. J Hepatol, 1999. **30**(6): p. 1138-45.
95. Herrera, M. and J.L. Garvin, *Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney*. Hypertension, 2005. **45**(6): p. 1062-7.
96. Cadenas, E., *Basic mechanisms of antioxidant activity*. Biofactors, 1997. **6**(4): p. 391-7.
97. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
98. Zhang, Q., et al., *A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **244**(1): p. 84-97.
99. Nguyen, T., P.J. Sherratt, and C.B. Pickett, *Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 233-60.
100. Hybertson, B.M., et al., *Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation*. Mol Aspects Med, 2011. **32**(4-6): p. 234-46.
101. Ney, P.A., et al., *Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(9): p. 5604-12.
102. Moi, P., et al., *Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9926-30.
103. Itoh, K., et al., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 76-86.
104. Kang, M.I., et al., *Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2046-51.
105. Kobayashi, A., et al., *Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7130-9.
106. Yamamoto, T., et al., *Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(8): p. 2758-70.
107. Huang, H.C., T. Nguyen, and C.B. Pickett, *Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42769-74.
108. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 313-22.

109. Jaiswal, A.K., *Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(10): p. 1199-207.
110. Motohashi, H. and M. Yamamoto, *Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism*. Trends Mol Med, 2004. **10**(11): p. 549-57.
111. Franklin, C.C., et al., *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 86-98.
112. Meister, A. and M.E. Anderson, *Glutathione*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 711-60.
113. Holmgren, A. and J. Lu, *Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 120-4.
114. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 323-54.
115. Surh, Y.J., et al., *Role of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 upregulation in adaptive survival response to nitrosative stress*. Arch Pharm Res, 2009. **32**(8): p. 1163-76.
116. Chan, E.C., et al., *Redox mechanisms of the beneficial effects of heme oxygenase in hypertension*. J Hypertens, 2014. **32**(7): p. 1379-86; discussion 1387.
117. Li, Q. and I.M. Verma, *NF-[kappa]B regulation in the immune system*. Nature Rev. Immunol., 2002. **2**: p. 725-734.
118. Philip, M., D.A. Rowley, and H. Schreiber, *Inflammation as a tumor promoter in cancer induction*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 433-9.
119. Hamada, S., A. Masamune, and T. Shimosegawa, *Inflammation and pancreatic cancer: disease promoter and new therapeutic target*. J Gastroenterol, 2014. **49**(4): p. 605-17.
120. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**: p. 860-867.
121. Lin, A. and M. Karin, *NF-[kappa]B in cancer: a marked target*. Semin. Cancer Biol., 2003. **13**: p. 107-114.
122. Tang, G., *Inhibition of JNK activation through NF-[kappa]B target genes*. Nature, 2001. **414**: p. 313-317.
123. Sethi, G., B. Sung, and B.B. Aggarwal, *Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 21-31.
124. Queisser, N., et al., *Aldosterone increases kidney tubule cell oxidants through calcium-mediated activation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(11): p. 1996-2006.
125. Rodino-Janeiro, B.K., et al., *Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology*. Vasc Health Risk Manag, 2013. **9**: p. 401-28.
126. Cheung, K.L. and A.N. Kong, *Molecular targets of dietary phenethyl isothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention*. AAPS J, 2010. **12**(1): p. 87-97.
127. Liu, X., et al., *T Cell Receptor-induced Nuclear Factor kappaB (NF-kappaB) Signaling and Transcriptional Activation Are Regulated by*

- STIM1- and Orai1-mediated Calcium Entry*. J Biol Chem, 2016. **291**(16): p. 8440-52.
128. Schupp, N., et al., *Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats*. FASEB J, 2011. **25**(3): p. 968-78.
129. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells*. Mol Carcinog, 2011. **50**(2): p. 123-35.
130. Queisser, N., et al., *Aldosterone activates transcription factor Nrf2 in kidney cells both in vitro and in vivo*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(15): p. 2126-42.
131. Kregge, J.H., et al., *A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice*. Hypertension, 1995. **25**(5): p. 1111-5.
132. Lamprecht, M.R., D.M. Sabatini, and A.E. Carpenter, *CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis*. Biotechniques, 2007. **42**(1): p. 71-5.
133. el Nahas, A.M., et al., *Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring*. Kidney Int, 1991. **40**(1): p. 29-34.
134. Veniant, M., et al., *Calcium blockade versus ACE inhibition in clipped and unclipped kidneys of 2K-1C rats*. Kidney Int, 1994. **46**(2): p. 421-9.
135. Kruger, N.J., *The Bradford method for protein quantitation*. Methods Mol Biol, 1994. **32**: p. 9-15.
136. M. D. Abramoff, P.J.M., S. J. Ram, *Image Processing with ImageJ*. Biophotonics International, 2004. **11**: p. 36-42.
137. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
138. Kobayashi, J., *Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to gamma-H2AX through FHA/BRCT domain*. J Radiat Res, 2004. **45**(4): p. 473-8.
139. Kuo, L.J. and L.X. Yang, *Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks*. In Vivo, 2008. **22**(3): p. 305-9.
140. Bianchi, S., R. Bigazzi, and V.M. Campese, *Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease*. Kidney Int, 2006. **70**(12): p. 2116-23.
141. Schupp, N., et al., *Aldosterone causes DNA strand breaks and chromosomal damage in renal cells, which are prevented by mineralocorticoid receptor antagonists*. Horm Metab Res, 2010. **42**(6): p. 458-65.
142. Fujimoto, T., et al., *Excretions of urinary albumin and various proteins increase in hypertension*. Blood Press, 2008. **17**(5-6): p. 270-3.
143. Lai, L., et al., *Aldosterone promotes fibronectin production through a Smad2-dependent TGF-beta1 pathway in mesangial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **348**(1): p. 70-5.
144. Sun, Y., et al., *Local angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in renal fibrosis of rats*. Hypertension, 2000. **35**(5): p. 1078-84.
145. Yuan, J., R. Jia, and Y. Bao, *Aldosterone up-regulates production of plasminogen activator inhibitor-1 by renal mesangial cells*. J Biochem Mol Biol, 2007. **40**(2): p. 180-8.

146. Eddy, A.A., *Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(2): p. F209-20.
147. Hung, C.N., et al., *Sulforaphane inhibits TNF-alpha-induced adhesion molecule expression through the Rho A/ROCK/NF-kappaB signaling pathway*. J Med Food, 2014. **17**(10): p. 1095-102.
148. Wu, J., et al., *Sulforaphane inhibits TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells via the reactive oxygen species-dependent pathway*. Oncol Rep, 2016. **35**(5): p. 2977-83.
149. DuPont, J.J. and I.Z. Jaffe, *30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: The role of the mineralocorticoid receptor in the vasculature*. J Endocrinol, 2017. **234**(1): p. T67-T82.
150. Queisser, N., et al., *Aldosterone activates the oncogenic signals ERK1/2 and STAT3 via redox-regulated mechanisms*. Mol Carcinog, 2017.
151. Huang, L.L., et al., *Aldosterone induces kidney fibroblast proliferation via activation of growth factor receptors and PI3K/MAPK signalling*. Nephron Exp Nephrol, 2012. **120**(4): p. e115-22.
152. Fu, G.X., et al., *Aldosterone-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells involves MR, ERK, and p38 MAPK*. Endocrine, 2012. **42**(3): p. 676-83.
153. Cascella, T., et al., *Aldosterone enhances IGF-I-mediated signaling and biological function in vascular smooth muscle cells*. Endocrinology, 2010. **151**(12): p. 5851-64.
154. Roux, P.P. and J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004. **68**(2): p. 320-344.
155. Morgan, M.J. and Z.G. Liu, *Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 103-15.
156. Dornas, W.C. and M.E. Silva, *Animal models for the study of arterial hypertension*. J Biosci, 2011. **36**(4): p. 731-7.
157. Jover, B. and A. Mimran, *Nitric oxide inhibition and renal alterations*. J Cardiovasc Pharmacol, 2001. **38 Suppl 2**: p. S65-70.
158. Baylis, C., B. Mitruka, and A. Deng, *Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage*. J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 278-81.
159. Stehr, C.B., et al., *Increased levels of oxidative stress, subclinical inflammation, and myocardial fibrosis markers in primary aldosteronism patients*. J Hypertens, 2010. **28**(10): p. 2120-6.
160. Cuzzocrea, S., et al., *Pyrrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(2): p. 496-510.
161. Yu, X.J., et al., *Inhibition of NF-kappaB activity in the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating cytokines and attenuating oxidative stress*. Toxicol Appl Pharmacol, 2015. **284**(3): p. 315-22.
162. Anrather, J., G. Racchumi, and C. Iadecola, *NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5657-67.

163. Kolyada, A.Y., N. Savikovsky, and N.E. Madias, *Transcriptional regulation of the human iNOS gene in vascular-smooth-muscle cells and macrophages: evidence for tissue specificity*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **220**(3): p. 600-5.
164. Lingappan, K., *NF- κ B in Oxidative Stress*. Current Opinion in Toxicology, 2017.
165. Chen, J., S.C. Rogers, and M. Kavdia, *Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay*. Ann Biomed Eng, 2013. **41**(2): p. 327-37.
166. Zielonka, J. and B. Kalyanaraman, *Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth*. Free Radic Biol Med, 2010. **48**(8): p. 983-1001.
167. Virdis, A., et al., *Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 504-10.
168. Jin, L., et al., *Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57**(3): p. 343-57.
169. Liddell, J.R., et al., *Pyrrolidine dithiocarbamate activates the Nrf2 pathway in astrocytes*. J Neuroinflammation, 2016. **13**: p. 49.
170. Kim, H.J. and N.D. Vaziri, *Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F662-71.
171. Vaziri, N.D., et al., *Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency*. Kidney Int, 2003. **63**(1): p. 179-85.
172. Tanito, M., et al., *Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(1): p. 89-97.
173. Zhan, C.D., et al., *Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet*. J Hypertens, 2004. **22**(10): p. 2025-33.
174. Shelton, P. and A.K. Jaiswal, *The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? FASEB J*, 2013. **27**(2): p. 414-23.
175. Malloy, M.T., et al., *Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: implications for degradation of NRF2 in the nucleus*. J Biol Chem, 2013. **288**(20): p. 14569-83.
176. Hong, F., M.L. Freeman, and D.C. Liebler, *Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(12): p. 1917-26.
177. Ligen, Z. and W. Yuanfeng, *Broccoli seed extracts but not sulforaphane have strong free radical scavenging activities*. International Journal of Food Science and Technology, 2017.
178. Alam, J. and J.L. Cook, *How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. **36**(2): p. 166-74.

179. Queisser, N., et al., *Blood pressure has only minor influence on aldosterone-induced oxidative stress and DNA damage in vivo*. Free Radic Biol Med, 2013. **54**: p. 17-25.
180. Jeggo, P.A. and M. Lobrich, *DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?* Oncogene, 2007. **26**(56): p. 7717-9.
181. Leone, A., et al., *Sulforaphane for the chemoprevention of bladder cancer: molecular mechanism targeted approach*. Oncotarget, 2017. **8**(21): p. 35412-35424.
182. Dandawate, P.R., et al., *Targeting cancer stem cells and signaling pathways by phytochemicals: Novel approach for breast cancer therapy*. Semin Cancer Biol, 2016. **40-41**: p. 192-208.
183. Yin, T.F., et al., *Research progress on chemopreventive effects of phytochemicals on colorectal cancer and their mechanisms*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(31): p. 7058-68.
184. Juge, N., R.F. Mithen, and M. Traka, *Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(9): p. 1105-27.
185. Heiss, E., et al., *Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 32008-15.
186. Prasad, A.K. and P.C. Mishra, *Mechanism of Action of Sulforaphane as a Superoxide Radical Anion and Hydrogen Peroxide Scavenger by Double Hydrogen Transfer: A Model for Iron Superoxide Dismutase*. J Phys Chem B, 2015. **119**(25): p. 7825-36.

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Nicole Schupp bedanken, für die Aufnahmen in ihre Arbeitsgruppe und die Ermöglichung dieser Promotion. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung, die fortwährende Unterstützung sowie die zahlreichen Ratschläge und die unermüdliche Geduld.

Ein weiteres besonderes Dankeschön möchte ich an Frau Dr. Nina Queisser richten. Sie war eine unverzichtbare Anlaufstelle während meiner Labortätigkeit. Neben der Durchführung des Tierversuchs, unterstützte sie mich auch in der Folgezeit bei Auswertung und statistischer Analyse. Nina, vielen Dank.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an die technischen Assistenten des Toxikologischen Instituts richten, insbesondere an Thomas Büdel, welcher maßgeblich für die Betreuung der Tiere zuständig war, aber auch an Miriam Kral, Silvana Wunram und Laura Vogel für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Ich bedanke mich bei den Kolleginnen und Kollegen des Toxikologischen Instituts für die schöne gemeinsame Zeit. Insbesondere möchte ich mich bei den Mitdoktoranden der AG Schupp bedanken. Arietta, Moritz und Eva, es war mir eine ganz besondere Freude.

Abschließend möchte ich meiner Freundin, meiner Familie und meinen Freunden für die erfahrene Hilfsbereitschaft, die Motivation und die Unterstützung ein herzliches Dankeschön aussprechen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe keine Doktorprüfung an einer anderen Hochschule abgelegt oder endgültig nicht bestanden.

Würzburg den 22.03.2018

Samuel Link

Lebenslauf

- Not included in online version

Wissenschaft:

Queisser, N., Oteiza, P. I., **Link, S.**, Hey, V., Stopper, H., Schupp, N.
Aldosterone activates transcription factor Nrf2 in kidney cells both in vitro and in vivo.
Antioxid Redox Signal., 2014

Queisser, N., Happ, K., **Link, S.**, Jahn, D., Zimnol, A., Geier, A., Schupp, N.
Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes.
Toxicol Appl Pharmacol, 2014

Samuel Link