

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Endokrinologie, Diabetes  
und Ernährungsmedizin der Medizinischen Fakultät Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Androgenen und Salzhaushalt auf die renale  
Mineralokortikoid- und Glukokortikoidrezeptor-Expression von  
orchiectomierten Wistar-Ratten

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von Meghna Jha  
aus Berlin

Datum der Promotion: 14.09.2018

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstrakt</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Einfluss des Geschlechts auf Hypertonie-bedingte Krankheitsbilder</b>	<b>10</b>
1.1.1 Bedeutung der arteriellen Hypertonie für Krankheitsbilder	10
1.1.2 Blutdruckunterschiede bei Männern und Frauen	11
<b>1.2 Einfluss von Natrium auf den Blutdruck</b>	<b>13</b>
<b>1.3 Bedeutung der Androgene bei der Blutdruckregulation</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Charakterisierung der Steroidrezeptoren</b>	<b>17</b>
1.4.1 Der Mineralokortikoidrezeptor und Glukokortikoidrezeptor	18
1.4.2 Der Androgenrezeptor	20
<b>1.5 Fragestellung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Studiendesign</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Versuchstiere</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Zielgene, Antikörper</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Molekulargewichtsstandard</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Materialien</b>	<b>25</b>
2.5.1 Chemikalien und Reagenzien	25
2.5.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.5.3 Pufferlösungen und biochemische Kits	27

---

2.5.4	Geräte	27
<b>2.6</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
2.6.1	Blutdruck- und Nierengewichtsmessung	28
2.6.2	Bestimmung der Hormonkonzentration im Serum	28
2.6.3	RNA-Extraktion aus Nierengewebe	29
2.6.4	Qualitätsprüfung der extrahierten RNA	29
2.6.5	cDNA-Synthese	30
2.6.6	Konventionelle PCR	31
2.6.7	Quantitative PCR	33
2.6.8	Western Blot	37
2.6.9	Statistische Auswertung, Software	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Phänotypisierung der Versuchstiere</b>	<b>43</b>
3.1.1	Androgensubstitution nach Gonadektomie	43
3.1.2	Blutdruck in Abhängigkeit von Androgen- und Kochsalzbehandlung	45
3.1.3	Relatives Nierengewicht der Wistar-Ratten	46
3.1.4	Serum-Aldosteronkonzentration der Wistar-Ratten	47
<b>3.2</b>	<b>Expression von renalem MR und GR unter unterschiedlicher Salzbelastung</b>	<b>48</b>
<b>3.3</b>	<b>Einfluss der Androgene auf die renale MR- und GR-Expression</b>	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Expression von renalem MR und GR unter AR- und MR-Blockade</b>	<b>51</b>
<b>3.5</b>	<b>Wechselwirkungen von Salzzufuhr und Androgensubstitution auf die renale MR- und GR-Expression</b>	<b>53</b>
<b>3.6</b>	<b>Expression von renalem TGF-<math>\beta</math>1 in Abhängigkeit von Salzzufuhr und Androgensubstitution</b>	<b>55</b>
<b>3.7</b>	<b>Proteinexpression des MR und GR unter unterschiedlichen Behandlung</b>	<b>56</b>

---

---

<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>58</b>
4.1	Validierung des <i>in vivo</i> Modells und Charakterisierung des Studiendesigns	58
4.2	Salzabhängige Regulation des renalen MR und GR	61
4.3	Androgen-abhängige Regulation des renalen MR und GR	64
4.4	Heterodimer-Formation zwischen MR und GR	67
4.5	Androgenrezeptor-unabhängige Wirkung des Flutamids	68
4.6	Regulation des MR-Zielgens TGF- $\beta$ 1 in der Niere	69
4.7	Limitationen der Arbeit	71
<b>5</b>	<b><i>Fazit und Ausblick</i></b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>85</b>
7.1	Eidesstaatliche Erklärung	85
7.2	Lebenslauf	86
7.3	Publikationen	87
7.4	Danksagung	88

---

## Abstrakt

Einführung: Der Zusammenhang zwischen Salzlast, Niere und arterieller Hypertonie ist gut definiert. Neuere Erkenntnisse deuten auf eine entscheidende Interaktion des mineralokortikoiden und glukokortikoiden Systems in der Blutdruckregulation hin. Darüber hinaus weisen Geschlechterunterschiede im Blutdruck auf eine modulierende Rolle von Androgenen hin. Wenig ist jedoch über die Wechselwirkung zwischen Androgenen und dem Mineralokortikoidsystem bekannt. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung der Androgensubstitution und des unterschiedlichen Salzstatus auf die renale Expression des Mineralokortikoid- (MR) - und Glukokortikoidrezeptors (GR).

Methoden: Männliche Wistar-Ratten im Alter von 8-10 Wochen wurden orchietomiert und erhielten eine Niedrigsalz- (< 0,03 % NaCl, Leitungswasser) oder Hochsalz-Diät (4 % NaCl, 0,09 % NaCl Trinkwasser) für 5 Wochen. Zusätzlich wurden sie entweder mit Placebo, Testosteronpropionat (Testo: 1 mg/ Tier) oder 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT: 1 mg/ Tier) als tägliche subkutane Injektion für 16 Tage behandelt (jede Gruppe n = 6). Außerdem wurde den Tieren der Androgenrezeptor (AR)-Antagonist Flutamid, der MR-Antagonist Spironolacton bzw. Placebo appliziert. Anschließend wurde der Blutdruck *in vivo* und Hormonwerte bei Dekapitation bestimmt. Im Fokus wurde die renale mRNA- und Proteinexpression von MR und GR nach Organentnahme untersucht.

Ergebnisse: Die Natriumbelastung führte zur Verminderung der MR mRNA als auch Protein-Expression bei den natriumreich ernährten Kontrolltieren. Dieser Effekt konnte durch Spironolacton aufgehoben werden. DHT rief eine Steigerung der MR mRNA Expression hervor, auch bei Tieren, bei denen der AR blockiert war. Interessanterweise führte die AR-Blockade durch Flutamid zu einer signifikanten Hochregulierung der MR mRNA bei Ratten mit einer Hochsalzdiät. Bei den salzarm ernährten Ratten hingegen konnte unabhängig von der Androgenbehandlung die Verminderung der MR mRNA Expression durch Flutamid beobachtet werden. In ähnlicher Weise wurde die GR mRNA Expression bei Ratten bei einer Hochsalzdiät unterdrückt. Dieser Effekt wurde durch Spironolacton aufgehoben. Die GR mRNA Expression wurde durch DHT unabhängig vom Salzstatus hochreguliert. Nach AR-Blockade war dieser Effekt weniger ausgeprägt. Flutamid führte zu einer Hochregulierung von GR mRNA bei den natriumreich ernährten Ratten, während in

---

den natriumarm ernährten Ratten eine Herunterregulation von GR mRNA unabhängig von der Androgenbehandlung beobachtet werden konnte.

Schlussfolgerung: Androgene erhöhen die renale MR und GR mRNA Expression in gleicher Weise. Außerdem reguliert Flutamid sowohl die renale MR als auch die GR mRNA Expression in Abhängigkeit vom Salzstatus der Diät, aber unabhängig von der Androgenbehandlung. Diese Daten bestätigen eine Wechselwirkung von Androgenen mit dem renalen Mineralokortikoidsystem und eine mögliche AR-unabhängige Wirkung von Flutamid auf die Blutdruckregulation. Der GR ist bei der Aufrechterhaltung der Natrium- und Wasser-Homöostase bereits unter physiologischen Bedingungen beteiligt.

Introduction: An essential link between salt loading, renal function and arterial hypertension is well defined. Furthermore, sex differences in blood pressure point to a modulating role of androgens. New insights suggest crucial interdependent actions of the mineralocorticoid and glucocorticoid system in blood pressure regulation. But little is known about the interaction between androgens and the mineralocorticoid system. This study examined the effect of androgen treatment and different salt status on renal mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptor (GR) expression.

Methods: Male Wistar rats aged 8-10 weeks were orchietomized and put on a low-salt (chow < 0.03 % NaCl, tap water) or high-salt diet (chow 4 % NaCl, water 0.09 % NaCl) for 5 weeks. They were treated with either placebo, testosterone propionate (Testo: 1 mg/ animal) or 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT: 1 mg/ animal) as a daily subcutaneous injection for 16 days (each group n = 6). In addition, the animals received the androgen receptor (AR) antagonist flutamide, the MR antagonist spironolactone or placebo, respectively. *In vivo* measurements were made for blood pressure and hormone levels measured after decapitation. Renal mRNA and protein expression of MR and GR were assessed after animal sacrifice.

Results: Sodium loading led to a downregulation of MR mRNA in control animals. This effect was abolished by spironolactone. DHT caused an upregulation of MR mRNA, but also in animals where AR was blocked. Interestingly, AR blockade by flutamide led to a significant upregulation of MR mRNA in rats on a high-salt diet, whereas downregulation of MR mRNA by flutamide independent of androgen treatment could be seen in salt-restricted rats.

---

Similarly, GR mRNA expression was suppressed in rats on a high-salt diet. This effect was abolished by spironolactone. GR mRNA expression was upregulated by DHT independent of the salt status. After AR blockade this effect was less pronounced. Flutamide itself led to an upregulation of GR mRNA in rats on a high-salt diet, whereas a downregulation of GR mRNA was seen in salt-restricted rats independent of androgen treatment.

Conclusions: Androgens increase renal MR and GR mRNA expression equally. Furthermore, flutamide regulates both renal MR and GR mRNA expression depending on the salt status of the diet in orchietomized rats, but irrespective of androgen treatment. These data reflect a crosstalk of androgens with the renal mineralocorticoid system and a possible AR-independent effect of flutamide on blood pressure regulation. GR contributes to maintenance of sodium and water homeostasis physiologically.

---

## Abkürzungsverzeichnis

11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraenoische Säure
$\beta$ 2-adR	$\beta$ 2-adrenerger Rezeptor
AAS	Anabol-androgene Steroide
ARE	Androgen-responsives Element
AR	Androgenrezeptor
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
ACE	Angiotensin-konvertierendes-Enzym
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CBBG	Coomassie-Brillant-Blau G-250
DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENaC	epithelialer Natriumkanal
GR	Glukokortikoidrezeptor
HKG	Housekeeping-Gen
HSP	Hitzeschockprotein
HET	Hormonersatztherapie
HRE	Hormon-responsives Element
KG	Körpergewicht
Kontr	Kontrolle
LDL	Low density Lipoprotein
mRNA	messenger-RNA/Boten-RNA
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
NCC	Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> -Kotransporter
NaCl	Natriumchlorid/Kochsalz
nGRE	negatives Glukokortikoidrezeptor-responsives Element
OD	optische Dichte
PCOS	Polyzistisches Ovar-Syndrom
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
PKA	Proteinkinase A
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rho-GTPase)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RT	Reverse Transkriptase
qPCR	Quantitative (Echtzeit-)PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SGK1	Serin-Threonin-Proteinkinase 1/Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase 1



---

SHR	Spontan- hypertensive Ratten
SNS	sympathisches Nervensystem
Testo	Testosteron
WHO	Weltgesundheitsorgansation
WNK4	Serin-Threonin-Proteinkinase 4/Lysin-defiziente Proteinkinase 4
ZG	Zielgen

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Durchschnittlicher systolischer Blutdruck nach Geschlecht und Altersgruppe in Deutschland.....	11
Abb. 2:	Einfluss der Hochsalzdiät bei der salzsensitiven Hypertonie in der Niere.	15
Abb. 3:	Behandlung der Ratten nach Gonadektomie.....	23
Abb. 4:	Typische Amplifikationskurven nach qPCR-Durchlauf im MyiQ™ 2-Cyclers. .....	35
Abb. 5:	Darstellung einer Standardkurve und PCR-Effizienzbestimmung.....	36
Abb. 6:	Systolischer Blutdruck in männlichen Wistar-Ratten in Abhängigkeit von Salzstatus und Androgensubstitution.....	46
Abb. 7:	Relatives Nierengewicht (beide Nieren in g/100g Körpergewicht) angegeben in Prozent vom Gesamtgewicht. ....	47
Abb. 8:	Serum-Aldosteronkonzentration in den jeweiligen Behandlungsgruppen.	48
Abb. 9:	Expression des renalen MR und GR in Abhängigkeit einer unterschiedlichen Salzaufnahme und einer Behandlung mit dem Mineralokortikoidantagonisten Spironolacton. ....	49
Abb. 10:	Expression des renalen MR und des renalen GR in Abhängigkeit einer Androgensubstitution und Behandlung mit Flutamid.....	51
Abb. 11:	Renale MR und GR mRNA Expression in Kontrollgruppen im Vergleich zur Flutamidgabe und Spironolactongabe. ....	52

---

Abb. 12:	Expression des renalen MR und des renalen GR in Abhängigkeit von Salzzufuhr und Androgensubstitution unter Zugabe von Flutamid oder Spironolacton.....	54
Abb. 13:	Genexpression des renalen TGF- $\beta$ 1 in Abhängigkeit von Salzzufuhr und Androgensubstitution. ....	55
Abb. 14:	Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von MR und GR in der Niere mittels Western Blot. ....	57
Abb. 15:	Wirkung von Natrium auf die Expression von MR und GR .....	62
Abb. 16:	Modell der kortikoiden Signaltransduktion. ....	63
Abb. 17:	Wirkung der Androgene Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) auf MR- und GR-Expression im Vergleich zu den jeweiligen, nicht mit Androgenen behandelten Kontrolltieren. ....	64
Abb. 18:	Wirkung der Androgene Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) auf MR- und GR-Expression im Vergleich zu den jeweiligen, nicht mit Androgenen behandelten Kontrolltieren. ....	65
Tab. 1:	Pipettierschema und reverse Transkription der isolierten RNA aus Nierengewebe.....	31
Tab. 2:	Pipettierschema und Thermoprofil für die Polymerasekettenreaktion.....	32
Tab. 3:	Pipettierschema und Thermoprofil der qPCR. ....	34
Tab. 4:	Zusammensetzung des Trenngels und Sammelgels für die SDS-Gelelektrophorese. ....	38
Tab. 5:	Softwarenutzung für die Datenauswertung und -darstellung. ....	42
Tab. 6:	Androgenkonzentration in den jeweiligen Behandlungsgruppen. ....	44

# 1 Einleitung

Schon lange ist bekannt, dass eine arterielle Hypertonie Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse wie Myokardinfarkt, Schlaganfall, Herz- und Niereninsuffizienz darstellt. Zusätzlich ist die arterielle Hypertonie weltweit für rund 50 % der Todesfälle durch kardiovaskuläre Ereignisse verantwortlich. So ist jeder Dritte weltweit laut dem World Health Statistics Report 2012 der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von einem erhöhten Blutdruck betroffen. Dieser Report gab zusätzliche Evidenz für den dramatischen Anstieg der weltweiten Prävalenz der arteriellen Hypertonie bei Erwachsenen. Hierbei sind überwiegend männliche Erwachsene erfasst worden [1, 2]. Dabei spielen unterschiedliche Faktoren eine auslösende Rolle. Gut erforscht sind Verhaltensrisiken, wie zum Beispiel Bewegungsmangel und ungesunde Ernährung (vor allem erhöhter Salzkonsum), zudem Genussmittel, wie Tabak und Alkohol. Doch scheint auch das männliche Geschlecht die Entstehung einer arteriellen Hypertonie zu begünstigen und ist Gegenstand dieser Arbeit, insbesondere in Hinblick auf eine erhöhte Salzaufnahme, wie sie in unserer heutigen Zeit allgegenwärtig ist.

## 1.1 Einfluss des Geschlechts auf Hypertonie-bedingte Krankheitsbilder

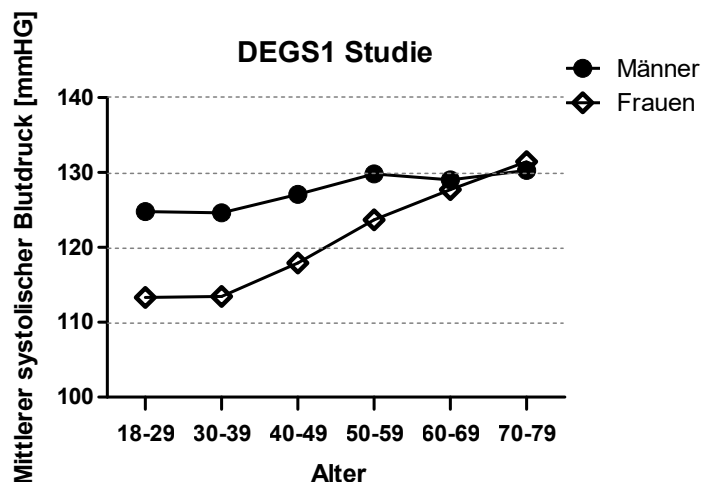
### 1.1.1 Bedeutung der arteriellen Hypertonie für Krankheitsbilder

Ab einem systolischen Blutdruckwert über 140 mmHg und/oder einem diastolischen Wert über 90 mmHg bei wiederholten Messungen gilt die Diagnose der arteriellen Hypertonie als gesichert [3]. Sie stellt eine der führenden Risikofaktoren für unterschiedliche Erkrankungen des kardiovaskulären und renalen Systems, wie Herzinfarkt und Schlaganfall oder aber auch chronische Niereninsuffizienz dar. Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind mit 40 % die häufigste Todesursache in Deutschland (Stand 2013). Zusätzlich zeigen zahlreiche Daten aus epidemiologischen Studien, wie aus der Framingham Heart Study, dem internationalen MONICA Project und vielen weiteren, dass mit zunehmenden Blutdruck auch das Risiko für Endorganschäden steigt [4-8]. So ist der Schaden an Gehirn, Herz, Niere und Gefäßen besonders kritisch und verantwortlich für die schlechte Prognose bei hohem Blutdruck [9].

### 1.1.2 Blutdruckunterschiede bei Männern und Frauen

Geschlechtsspezifische Blutdruckunterschiede sind schon lange Bestandteil intensiver Forschung. Männer zeigen im erwachsenen Alter höhere Blutdruckwerte als Frauen gleicher Altersgruppen [10]. Querschnittsstudien von NHANES sammelten Daten aus der gesamten US-Population aus allen Alters- und ethnischen Gruppen zwischen 1988–1994 und 1999–2004. Hierbei wurden höhere mittlere systolische Blutdruckwerte für Männer als für Frauen im Alter von 18–59 erfasst. Ab dem 6. Lebensjahrzehnt kam es zu einer Häufigkeitsangleichung für beide Geschlechter [10–12].

In Deutschland ermittelten die regionalen SHIP- und KORA-Studien von 1997–2001 gleichermaßen eine erhöhte Hypertonieprävalenz für Männer im Vergleich zu Frauen im Alter von 25–74 [13]. Die Arbeit von ERBEL ET AL. von 2008 untersuchte ebenfalls kardiovaskuläre Risikofaktoren in Deutschland. Hierbei lag die Hypertonie-Prävalenz für Männer bei 46,3 % und für Frauen bei 30,8 % im Alter von 45–75 Jahren [14]. In der neueren Gesundheitsberichterstattung des Robert-Koch-Instituts „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS1), in welcher Daten bzgl. des Blutdruckes in Deutschland von 2008–2011 gesammelt worden sind, bestätigte sich ebenfalls der auffällige Blutdruckunterschied sowie die Lebenszeitprävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zwischen Männern und Frauen (Abb. 1) [9, 15].



**Abb. 1: Durchschnittlicher systolischer Blutdruck nach Geschlecht und Altersgruppe in Deutschland.** Datenbezug: Robert-Koch-Institut – „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS1)

Des Weiteren zeigen die derzeitigen Blutdruckdaten, dass sich bei Frauen der Blutdruck erst postmenopausal dem der Männer gleichen Alters weitestgehend annähert und teilweise sogar übersteigt [10, 11, 13, 14, 16, 17]. Kinder bis zum Eintritt

der Pubertät waren von dem zu beobachtenden sexuellen Dimorphismus ebenfalls nicht betroffen [18].

Zur weiteren Klärung der Geschlechterunterschiede in Hinblick auf den Blutdruck wurden unterschiedliche Tiermodelle herangezogen. In Beobachtungsstudien an hypertensiven Tiermodellen zeigten Männchen einen höheren Blutdruck als altersgleiche Weibchen [10, 19, 20]. Beispielsweise in spontan hypertensiven Ratten (SHR), Dahl salz-sensitiven Ratten oder aber auch in New Zealand hypertensiven Ratten wurden erhöhte Blutdruckwerte in den männlichen Tieren im Gegensatz zu den weiblichen Tieren detektiert [20, 21]. VAN LIERE untersuchte den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) in 147 erwachsenen Hunden und fand heraus, dass die männlichen Hunde im Durchschnitt einen um 8 mmHg höheren MAP als die weiblichen Tiere besitzen [22].

Diese Beobachtungen implizieren eine zentrale Rolle des Geschlechts bzw. der Sexualhormone in der Entstehung der arteriellen Hypertonie. So waren RECKELHOFF ET AL. und CHEN ET AL. unter den Ersten, welche die Bedeutung von Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron für die Blutdruckerhöhung hervorhoben. Sie wiesen nach, dass sich der Blutdruck kastrierter männlicher SHR dem weiblicher SHR angleich, während die Ovariectomie bei den weiblichen SHR keinen Einfluss auf den Blutdruck nahm. Hingegen führte die Behandlung ovariectomierter Weibchen und kastrierter Männchen mit Testosteron gleichermaßen zu einer Hypertonie [19, 23, 24].

Weiblichen Hormonen bzw. Östrogenen wurde hingegen lange Zeit eine protektive Wirkung auf den Blutdruck und das kardiovaskuläre Risiko zugeschrieben. Interessanterweise wurde in klinischen Studien mit Östrogenen zur Behandlung postmenopausaler Frauen keine Verbesserung des kardiovaskulären Risikos beobachtet [25]. So zeigte die „Women’s Health Initiative Study 2002“, welche die Hormonersatztherapie (HET) bei postmenopausalen Frauen als erste prospektive, randomisierte Kontrollstudie untersuchte, die erhebliche Zunahme um 29% an Herzinfarkten und 41% an Schlaganfällen durch die HET [26, 27]. So ist die Annahme einer protektiven Wirkung der Östrogene kontrovers zu betrachten. Sie soll im Folgenden jedoch nicht näher beleuchtet werden.

## 1.2 Einfluss von Natrium auf den Blutdruck

Salz (NaCl) gilt als wichtiger Einflussfaktor einer Hypertonie. So ist die Eliminierung überschüssigen Natriums über die Nieren eine Schlüsselkomponente der Blutdruckregulation [28]. Im gesunden Organismus wird dies über das renale Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) gesteuert. Am Anfang der Kaskade einer Reihe von enzymatischen Spaltungen steht das Enzym Renin, welches in juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriolen in der Niere freigesetzt wird. Dieses spaltet daraufhin das Angiotensinogen, einem  $\alpha$ -2-Globulin, welches von der Leber gebildet und in den Kreislauf sezerniert wird, zu dem Peptid Angiotensin I (Ang I). Ang I wird wiederum von dem in der Lunge synthetisierten Angiotensin-konvertierendes-Enzym (ACE) in den aktiven Metaboliten Angiotensin II (Ang II) gespalten. Ang II führt aktiv zu einer Vasokonstriktion in den Blutgefäßen unter Bindung an die sogenannten Angiotensin I und II -Rezeptoren, welche heterogen in den Geweben exprimiert werden. Zusätzlich werden Natriumkanäle im proximalen und distalen Tubuli induziert. Hierbei wird der systemische Blutdruck gesteigert. Außerdem bewirkt Ang II die Aldosteronfreisetzung in der Nebenniere. Aldosteron führt durch Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) zur vermehrten Natrium- und Wasserretention in der Niere [29].

Der MR ist ein zentraler Bestandteil bzw. Effektor des RAAS und ruft über unterschiedliche Zielgene, wie zum Beispiel die Natriumtransporter ENaC und NCC, einen Blutdruckanstieg hervor. Hierbei wurde festgestellt, dass unter Einnahme von Spironolacton der Blutdruck effektiv gesenkt werden kann. Deswegen wird Spironolacton bei refraktärer Hypertonie häufig zusätzlich eingesetzt.

Trotz der Kenntnis vom Zusammenhang zwischen Salzzufuhr und Blutdruck nimmt nach Angaben der WHO der Großteil der Weltbevölkerung immer noch fast das Doppelte der empfohlenen Menge von 5 g Salz täglich zu sich [30].

Dies liegt mitunter auch an starken Kontroversen unter Forschern über die Effekte einer Salzbeschränkung [31-37]. GRAUDAL ET AL. nehmen sogar an, dass eine Salzbeschränkung schädliche Effekte auf Hormon- und Lipidmetabolismus haben könnte. So stiegen unter einer Salzrestriktion Noradrenalin, Cholesteron und LDL-Cholesteron an [37]. Hierbei ist zu vermerken, dass die Daten von unterschiedlichen Studien und unterschiedlichen Patientenkollektiven retrospektiv beurteilt wurden und

der kausale Zusammenhang bislang nicht in prospektiven Langzeitstudien validiert wurde.

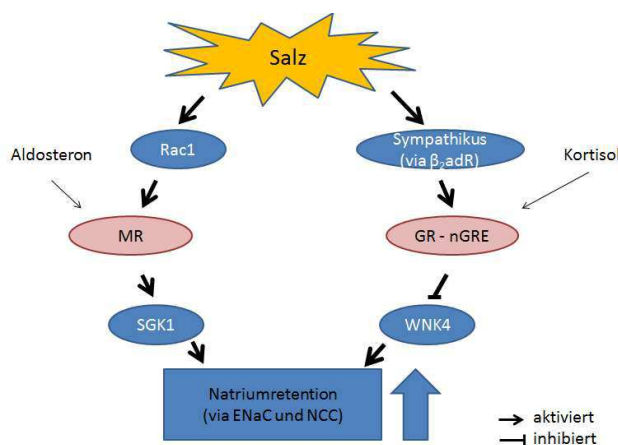
Andere Metaanalysen zeigten eine geringfügige Senkung des Blutdruckes durch reduzierte Salzaufnahme bei normotensiven und hypertensiven Patienten. Einige Studien zeigten außerdem, dass nicht alle Menschen unter einer natriumreichen Diät eine Hypertonie entwickeln. So besteht Heterogenität bei der Blutdruckantwort auf eine unterschiedliche Salzlast [31, 38].

Zur Beschreibung dieser Beobachtungen führten unter anderem DAHL ET AL. nach etlichen Versuchen an Ratten den Begriff der Salzsensitivität ein. Die Salzsensitivität beschreibt, dass der untersuchte Organismus unter einer Salzrestriktion mit einer Senkung des Blutdruckes antwortet bzw. unter einer erhöhten Salzzufuhr mit einem Blutdruckanstieg [39]. WEINBERGER ET AL. untersuchten mittels einer prospektiven Kohortenstudie von 378 normotensiven und 198 hypertensiven Probanden unter kontrollierter Salzdepletion und anschließender Blutdruckmessung die Salzsensitivität. Hierbei wurde ein Blutdruckabfall von 10 mmHg als salzsensitiv definiert. Dabei ermittelten sie eine 26 %-ige Salzsensitivität im normotensiven Kollektiv und eine 58 %-ige Salzsensitivität im hypertensiven Kollektiv, wobei in beiden Gruppen die Salzsensitivität mit steigendem Alter zunahm [40].

Dieser Effekt wurde zunächst auf die renale Dysbalance der Druck-Natriurese-Kurve in der Niere zurückgeführt. Diese besagt, dass bei Rechtsverschiebung ein erhöhter Druck zur Natriumeleminierung in der Niere benötigt wird und dies somit zum Bluthochdruck führt [31, 38, 41]. GUYTON ET AL. postulierten zudem, dass eine vermehrte Salzzufuhr nicht nur bei Salzsensitivität, sondern auch langfristig zu einer Verschiebung der Druck-Natriurese-Verhältnisse in der Niere führt und somit eine Hypertonie begünstigt.

Neuere Studien rücken nun auch andere Mechanismen bei der salzempfindlichen Hypertonie in den Vordergrund. So wurde unter anderem auch ein erhöhter Tonus der Gefäßmuskelnzellen, eine erhöhte lokale RAAS-Aktivierung in verschiedenen Geweben, sowie eine erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems (SNS) für die salzinduzierte Hypertension verantwortlich gemacht und verdeutlichen das multifaktorielle Zusammenspiel bei der Blutdruckantwort [42, 43].

MR und GR spielen eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der salzinduzierten Hypertonie durch gesteigerte ENaC- und NCC-vermittelte Salzretention im Nierentubulussystem [44-46]. Zum einen kann über die  $\beta_2$ -adrenerg stimulierten GR ein „negatives Glukokortikoidrezeptor-responsives Element“ (nGRE) und „with-no-lysine kinase (WNK)-4“ reguliert und somit die Natriumresorption gesteigert werden. Zum anderen kann über „Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1“ (RAC1) die MR-Aktivierung und die damit einhergehende Steigerung der Transkriptionsrate für beispielsweise ENaC und NCC die Natriumresorption erhöht werden (Abb. 2) [44].



**Abb. 2: Einfluss der Hochsalzdiät bei der salzsensitiven Hypertonie in der Niere.** Erhöhte Salzlast aktiviert bei salzsensitivem Phänotyp sowohl den Rac1-MR-SGK1 Signalweg als auch den  $\beta_2$ -adrenerg stimulierenden GR-WNK4 Signalweg und führt hierbei zur Natriumretention. Quelle: modifiziert nach NISHIMOTO M ET AL., 2015

### 1.3 Bedeutung der Androgene bei der Blutdruckregulation

Androgene werden schon lange in Hinblick auf die Blutdruckregulation untersucht. Der Zusammenhang wurde deutlich durch die Kastration männlicher Ratten, deren Blutdruck erheblich sank und sich dem von Weibchen angleich. Gleichzeitig bewirkte die Behandlung sowohl weiblicher als auch männlicher Ratten mit Testosteron einen Anstieg des Blutdruckes [47-51].

Auch beim Mensch konnten Androgene mit einem erhöhten Blutdruck assoziiert werden. So konnte bei Frauen mit einem PCO-Syndrom, welche erhöhte Testosteronwerte im Blut aufwiesen, auch erhöhte Blutdruckwerte gemessen werden [52]. Gleichzeitig wird vermutet, dass extern zugeführte anabol-androgene Steroide (AAS) ebenfalls erhöhte Blutdruckwerte hervorrufen. So konnte eine angestiegene Inzidenz der Blutdruckwerte unter AAS in einem kleinen Kollektiv nachgewiesen



werden. Bedingt durch das erhebliche Nebenwirkungsprofil der AAS gibt es jedoch keine umfangreichen Studien, die diese Daten validieren [53-55].

Androgene gehören zu den in der Nebennierenrinde und den Gonaden synthetisierten Steroidhormonen. Sie sind essentiell für die Bildung und Reifung der männlichen Geschlechtsorgane und -merkmale. Die wichtigsten Vertreter sind das Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT). Beide Androgene binden an denselben Androgenrezeptor (AR), wobei DHT mit einer vielfach höheren Affinität an den AR bindet und somit ausschlaggebend für die Androgensensitivität der Zielorgane ist. Testosteron ist beim männlichen Geschlecht jedoch das vorherrschende Androgen im Körper und wird hauptsächlich in den Testes gebildet und sezerniert (> 95 %). Das Enzym 5 $\alpha$ -Reduktase konvertiert in den peripheren Organen Testosteron zu 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron. Andererseits kann Testosteron in den Zielorganen durch das Enzym Aromatase auch zu Estradiol, dem weiblichen Geschlechtshormon, umgewandelt werden.

Die biologische Wirkung der Androgene wird hauptsächlich durch Bindung an den AR, als klassisch genomischer Signalweg, hervorgerufen. Hierbei wird unter Konformationsänderung und Dimerisierung des ARs die Transkription von unterschiedlichen Zielgenen aktiviert oder supprimiert. Dies ändert die Expression der androgen-abhängigen Zielgene und moduliert somit die zellulären bzw. biologischen Funktionen und Morphologie.

Zusätzlich zum klassischen Signalweg können Androgene jedoch auch nicht-genomisch, unabhängig von der Zielgen-Transkription unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. Hierbei wird vermutet, dass unterschiedliche Rezeptoren, unter anderem auch membranständige Rezeptoren, eine Rolle spielen. So sollen Androgene in der Lage sein unter Aktivierung von Second Messenger, wie dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) und der Proteinkinase-A (PKA) oder durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die intrazelluläre Kalziumkonzentration anzuheben. Die Kalziumerhöhung wiederum leitet diverse Signaltransduktionskaskaden über PKA, Proteinkinase C (PKC) und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) ein, welche zur Modifikation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, einschließlich des ARs führen.

Androgene führen unter Aktivierung unterschiedlicher Mechanismen zu kardiovaskulären Veränderungen, die eine Hypertonie begünstigen können. So

zeigten Untersuchungen, dass Testosteron auf den vaskulären Tonus in den meisten Gefäßtypen sowohl dilatativ als auch konstriktiv wirken kann [56]. Insbesondere die Abnahme von 20-Hydroxyeicosatetraenoischer Säure (20-HETE) sensibilisiert androgen-vermittelt die glatten Muskelzellen der Blutgefäße für konstriktive Stimuli [57].

Des Weiteren fördern die Androgene auch die Ausbildung der Atherosklerose im Gefäßbett durch Endothelschäden. Die Atherosklerose führt zur Dysbalance zwischen vasodilatativen und –konstriktiven Substanzen in den Gefäßwänden. Dies bedingt die progrediente arterielle Gefäßstarrheit, welche wiederum eine Hypertonie begünstigt [57, 58].

Interessanterweise konnte auch eine Androgen-abhängige Modifizierung renaler Mechanismen der Blutdruckregulation beobachtet werden. So zeigen Männer und Frauen auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der Nierenfunktion und im RAAS. In der Niere führt die anabole Wirkung der Androgene zum Wachstum der proximalen Tubuluszellen [59]. Außerdem besitzen Männer eine höhere Plasmareninaktivität als Frauen [60]. Androgene vermögen zudem die Angiotensinogen-Synthese und Angiotensin II, Komponenten des RAAS, zu stimulieren. Hierbei scheinen Androgene die Natriumreabsorption im proximalen Tubulus zu steigern. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Androgene die Expression des Natriumtransporter, wie zum Beispiel den ENaC, intrarenal hochregulieren [61, 62]. So wird stark vermutet, dass die Hochregulierung des RAAS durch Androgene zu dem sexuellen Dimorphismus bei der Entstehung einer Hypertonie und chronischen Nierenschäden beiträgt [47, 50, 61-64].

#### **1.4 Charakterisierung der Steroidrezeptoren**

Die Aufgabe von Steroidhormonrezeptoren im Hormonregelkreis ist es, Steroidhormone wie beispielsweise Glukokortikoide, Mineralokortikoide, Androgene, Progesteron oder Östrogene zu binden, welche dadurch an den Zielzellen ihre Wirkung entfalten. Das wird unter anderem durch eine bedarfsgerechte Anpassung der Aktivität und Expression des Ligand-Rezeptor-Komplexes in der Zelle bei unterschiedlichen Anforderungen des Körpers erreicht [65].

Die Steroidrezeptoren zählen zu den ligandenabhängigen nukleären Rezeptoren NR3, welche dafür bekannt sind, als Transkriptionsfaktoren zu agieren. Die Rezeptoren befinden sich intrazellulär sowie nukleär und liegen gebunden an Hitzeschockproteine (HSP) vor. Nachdem das Hormon an den Rezeptor gebunden hat, verbindet dieser Komplex sich mit einem zweiten Ligand-Rezeptor-Komplex und bildet ein Homo- bzw. Heterodimer. Daraufhin löst sich das HSP. Im Zellkern kann das Dimer an das Hormon-responsive Element (HRE) in der Promotor-Region seiner Zielgene binden. Somit wird die Transkription hinsichtlich Aktivierung oder Suppression beeinflusst [65-69].

Trotz der großen strukturellen Ähnlichkeiten binden Steroidrezeptoren eine Vielfalt von Liganden, welches in einer noch größeren Diversität an Funktionen resultiert. Hierbei spielt vor allem der gebundene Ligand, jedoch auch die gewebe-spezifische Expression der Rezeptoren, eine entscheidende Rolle. Zusätzlich kann der Ligand-Rezeptor-Komplex noch über bindende Proteine oder Phosphorylierung in ihren gewebespezifischen Konformationen und Funktionen modifiziert werden [67].

In diesem Kapitel soll der Aufbau und die Funktion der Steroidrezeptoren, die wesentlich an der Blutdruckregulation beteiligt sind, näher beschrieben werden. Hierbei sind der MR und seine aktivierten Zielgene Schlüsselkomponenten bei der Entstehung der Hypertonie. Doch auch der Glukokortikoidrezeptor (GR) und der Androgenrezeptor (AR) rücken immer mehr in den Fokus [61, 62, 70]. Wegen ihrer Analogien und der interagierenden Wirkung auf den Salztransport in der Niere werden der MR und der GR in dieser Arbeit gemeinsam betrachtet [44, 71].

#### **1.4.1 Der Mineralokortikoidrezeptor und Glukokortikoidrezeptor**

Der Mineralokortikoidrezeptor und der Glukokortikoidrezeptor sind für die physiologische Regulation der körperlichen Funktionen unerlässlich. Dabei wird der GR in fast allen Geweben exprimiert. Der MR ist in Mineralokortikoid-spezifischen Geweben wie Niere, Kolon und Parotis, aber auch in nicht Mineralokortikoid-spezifischen Geweben wie Gehirn oder Herz vorzufinden [72, 73]. So ist mittlerweile auch bekannt, dass der MR nicht nur an Salz- und Wasserhaushalt, sondern auch an Inflammation, Kollagenbildung, Fibrose und Nekrose beteiligt ist [74-76]. Vermehrte MR-Expression wird somit auch mit Endorganschäden an Herz und Niere assoziiert.

Der GR ist essentiell für den Energiehaushalt. Unter anderem reguliert er die Glukoneogenese und wird bei Stress und Inflammation aktiviert [77].

Der GR wird grundsätzlich in jeder Zelle exprimiert. Renal treten der MR und GR in den jeweiligen Abschnitten des Tubulussystems unterschiedlich stark exprimiert auf. In den Zellen, in denen sie gleichermaßen verteilt sind, interagieren sie auf molekularer und funktionaler Ebene. Dies geschieht in manchen Zellen auf synergistische und in anderen auf antagonistische Weise. So besteht die Annahme, dass die Aktivierung von MR und GR in den Zellen in Balance zueinanderstehen muss, um die physiologische Homöostase aufrechtzuhalten [78].

Beide Rezeptoren gehören zur Familie der 3-Ketosteroidrezeptoren, welche im inaktiven Zustand an Chaperonen gebunden vorliegen, welche wiederum die Proteinfaltung des jeweiligen Proteins bestimmen. Insbesondere das HSP 70 und HSP 90 stabilisieren die Steroidrezeptoren in ihrer inaktiven Form [79, 80]. Erst durch Ligandenaktivierung, vor allem durch Kortisol und Aldosteron, ändern MR und GR ihre Konformation, um Dimere zu formen. So werden die Transkription von Effektorgenen entweder initialisiert oder supprimiert. Aufgrund der starken strukturellen Homologie zwischen MR und GR, können dieselben Steroidhormone gebunden werden und unter Homo- oder Heterodimerbildung an viele gleiche HREs der DNA ansetzen. Zusätzlich teilen sie sich auch koregulatorische und -suppressorische Proteine zur Regulation von Effektorgenen auf DNA-Ebene [67, 78]. Trotz dieser Entdeckungen werden sie häufig getrennt betrachtet und ihre unterschiedlichen Effekte auf den Organismus hervorgehoben. Auch bei der Aufrechterhaltung des Natrium-Wasserhaushaltes ist der MR als unerlässlich beschrieben, während dem GR unter pathophysiologischen Bedingungen eine aktivere Rolle zugeschrieben wird.

Grundsätzlich teilen sich alle Steroidhormonrezeptoren ähnliche strukturelle Bereiche, die für deren Funktion unerlässlich sind: eine Amino- oder N-terminale Region (NTD), eine DNA-bindende Domäne (DBD) und die Ligand-bindende Domäne (LBD) am Carboxyl-Terminus. Hierbei sind sich der MR und der GR von allen Steroidrezeptoren am ähnlichsten in ihrer Struktur. Sie zeigen Homologien von ca. 57 % in der LBD, 94 % in der DBD und ca. 15 % in der NTD auf [78].

Insbesondere die Homologie in der LBD führt für den MR zu ähnlichen Bindungsaffinitäten für die Liganden Kortisol bzw. Kortikosteron und Aldosteron,

während der GR eine ca. 10-fach geringere Affinität für Aldosteron aufweist. Da Aldosteron außerdem eine 100-fach geringere Konzentration als Kortisol im Blut aufweist, wird angenommen, dass der GR unter physiologischen Bedingungen nicht durch Aldosteron aktiviert wird. So konkurrieren Aldosteron und Kortisol bevorzugt um den MR, wobei das Kortisol bzw. Kortikosteron in sehr viel größeren Mengen vorliegt und somit das Aldosteron verdrängt.

In typischen MR-Zielgeweben, wie Niere, Kolon und Speicheldrüsen, wird die MR-Selektivität durch das Enzym 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ -HSD2) bestimmt. Die 11 $\beta$ -HSD2 metabolisiert das Kortisol und Kortikosteron zu dem inaktiven Kortison bzw. 11-Dehydro-Kortikosteron, welche nicht den MR binden, sodass bevorzugt Aldosteron an den MR binden kann.

In der Niere des Hasen zeigten FARMAN ET AL. mittels immunohistochemischer Färbung, dass überall dort, wo der MR exprimiert wird, auch der GR exprimiert ist [81]. Nichtsdestotrotz wurde lange eine Rolle des GR am Natrium-Wasserhaushalt ausgeschlossen. Neuere Untersuchungen vermuten jedoch ein Zusammenspiel zwischen MR und GR beim Salztransport und der Regulierung des Salzhaushaltes in unterschiedlichem Maße, insbesondere unter pathophysiologischen Zuständen [44, 45, 71, 82].

So scheinen beide Rezeptoren in der Lage zu sein, Natriumtransporter in der Niere als Zielgene zu regulieren. Hierbei spielen vor allem der ENaC und der NCC eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Hypertonie [44, 70].

#### **1.4.2 Der Androgenrezeptor**

Der Androgenrezeptor zählt auch zur Familie der Steroidrezeptoren und besitzt somit dieselbe Grundstruktur. Zudem lässt er sich aufgrund seiner Sequenzhomologie zur 3-Ketosteroidrezeptoren-Untergruppe zuordnen, welcher außerdem der MR, GR und PR angehören.

Für den AR sind zwei Isoformen bekannt. Er wird entweder mit der Bindung von Testosteron oder dem spezifischeren Metabolit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) aktiviert. Darauf folgend wandert der Androgen-Androgenrezeptor-Komplex intrazellulär in den Zellkern und bindet dort unter Dimerbildung an sein Androgen-spezifisches Element

(ARE) in der Promotor-Region seiner Zielgene, worüber die Transkription dieser induziert oder gehemmt wird.

Außer in den männlichen Geschlechtsorganen kommt der AR in einer Vielzahl anderer Organe vor, so auch in Herz- und gestreifter Muskulatur sowie in der Niere [83]. Bekannt ist, dass beim Mann der AR die Nierenreifung während der Embryogenese reguliert. Auch spielt der AR eine Rolle bei der Zellstimulation in Richtung Hypertrophie und Hyperplasie [84].

Die Liganden des Androgenrezeptors, Testosteron und das spezifischere DHT, binden mit unterschiedlicher Affinität an den AR. Dabei zirkuliert im Kreislauf vermehrt Testosteron, welches gewebespezifisch durch das Enzym 5 $\alpha$ -Reduktase zum potenteren DHT umgewandelt wird. Allgemein nimmt man an, dass, obwohl Testosteron ähnliche Effekte wie das DHT am Androgenrezeptor hervorruft, das Testosteron eher als Prohormon für das DHT und das Estradiol dient, wobei das Estradiol seine Funktion über Bindung an den Estrogenrezeptor hervorruft.

## **1.5 Fragestellung der Arbeit**

Trotz des fundierten Wissens über die essentielle Bedeutung der Niere und des mineralokortikoiden Systems bei der Langzeitregulation des Blutdrucks ist die Wirkung der Androgene auf das mineralokortikoide System bisher noch nicht geklärt. Aufgrund des stark erhöhten Salzkonsums in der allgemeinen Bevölkerung ist auch von Interesse, ob die Salzzufuhr bzw. die unterschiedliche RAAS-Aktivierung durch Salz die Wirkung der Androgene auf die renale Regulation des Blutdruckes modifiziert.

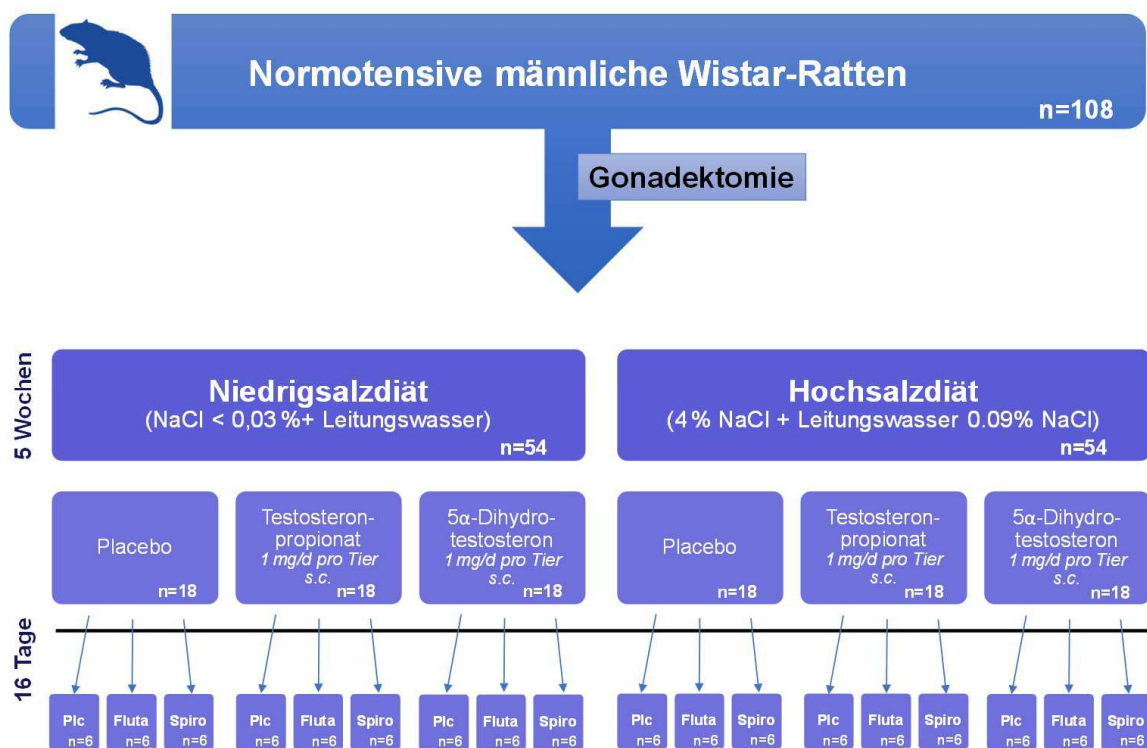
Auf Basis dieses Forschungsstandes ist das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss männlicher Hormone auf die renale MR- und GR-Regulation in Abhängigkeit der Salzzufuhr zu untersuchen. Konkret wurden folgende Fragestellungen dafür formuliert:

1. Wirken Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron auf die Regulation des mineralokortikoiden Systems in der Niere?
2. Bestehen synergistische Wirkungen zwischen Androgenen und erhöhter Salzzufuhr auf das mineralokortikoide System in der Niere?
3. Findet eine Regulation des GR in der Niere unter dem Aspekt der Mitwirkung an der Natriumregulation statt?
4. Kann durch den Androgenrezeptorblocker Flutamid die Wirkung der Androgene aufgehoben bzw. abgeschwächt werden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Zur Untersuchung der Wirkung von Androgenen und Salz auf die renale Expression von MR und GR wurde ein Rattenmodell gewählt. Hierzu wurden normotensive, männliche Wistar-Ratten gonadektomiert und daraufhin randomisiert in Gruppen von je sechs Tieren eingeteilt. Eine Hälfte der Ratten wurde auf eine natriumarme (NaCl < 0,03 % + Leitungswasser) und die andere Hälfte auf eine natriumreiche (NaCl 4 % + 0,09 %-ige Kochsalzlösung aus Leitungswasser hergestellt) Diät gesetzt.



**Abb. 3: Behandlung der Ratten nach Gonadektomie.** Plc: Placebo, Fluta: Flutamid, Spiro: Spironolacton

Nach einer anfänglichen Adaptionsperiode an den Blutdruck von 18 Tagen erhielten die Wistar-Ratten zusätzlich zu der jeweiligen Diät täglich entweder in Form von s.c.-Injektionen Testosteronpropionat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; 2,86 mg/kg KG gelöst in Oleum sesami), 5α-Dihydrotestosteron (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; 2,86 mg/kg KG gelöst in Oleum sesami) oder Placebo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Oleum sesami) für weitere 16 Tage. Ferner erhielten die Gruppen entweder den AR-Inhibitor Flutamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH,



München; 30 mg/kg KG gelöst in Oleum sesami/Ethanol (v/v 11:1)), den MR-Inhibitor Spironolacton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; 50 mg/kg KG gelöst in Oleum ricini/Benzylbenzoat (v/v 5:1)) oder Placebo (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; Oleum sesami).

Am Tag der letzten Injektion wurden die Tiere getötet. Anschließend wurden beide Nieren und Blutserum zur weiteren Untersuchung entnommen. Die darauffolgende Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2 Versuchstiere

Zur Durchführung der Experimente wurden ausschließlich männliche normotensive Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 180–200 g von der Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services Sülzfeld, bezogen. Die folgende Rattenhaltung und das *in vivo*-Rattenmodell erfolgten wie zuvor beschrieben [85, 86].

Pro Käfig wurden drei Tiere gehalten; diese hatten freien Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser. Die Raumtemperatur lag während des gesamten Versuchsablaufs bei  $22\text{--}24^{\circ}\text{C}$ , während die Luftfeuchtigkeit zwischen 50–60% konstant gehalten wurde. Die Tiere waren einem Tag-Nacht-Rhythmus im Intervall von 12 Stunden Licht (eingeschaltet um 6.00 Uhr) und 12 Stunden Dunkelheit (ausgeschaltet um 18.00 Uhr) ausgesetzt.

24 Stunden nach Ankunft der Tiere wurden diese unter Isofluran-Anästhesie gonadektomiert. Die Tierhaltung und -versuche wurden unter Überwachung und Genehmigung der Tierversuchskommission des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin und unter Berücksichtigung gesetzlicher Tierschutzvorgaben (Tierversuchsnummer: 0312/06) ausgeführt.

Die Orchiektomie erfolgte durch einen medianen Skrotalschnitt, wobei Testes und Epididymi *en bloc* reseziert wurden.

## 2.3 Zielgene, Antikörper

Genassay	Hersteller
TaqMan® Gene Expression Assay NR3C1 Rn 01405580_m1 (GR)	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Gene Expression Assay NR3C2 Rn00565562_m1 (MR)	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Gene Expression Assay TGFB1 Rn01475963_m1 (TGF-β1)	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents (18s ribosomale RNA)	Applied Biosystems, Foster City, USA

Antikörper	Herkunft
Anti-GR (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-MR (rMR1-18 6G1)	Labor von Celso Gomez-Sanchez, University of Mississippi Medical Center, Jackson, USA
Anti-β-Actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Kaninchen IgG- Meerrettichperoxidase (von Ziege)	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Anti-Maus IgG-Meerrettichperoxidase (vom Schaf)	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK

## 2.4 Molekulargewichtsstandard

Molekulargewichtsstandard	Hersteller
HyperLadder™ I (200–10 000 bp)	Bioline, Luckenwalde
HyperPAGE (10–190 kDa)	Bioline, Luckenwalde
HyperPAGE II (10–250 kDa)	Bioline, Luckenwalde

## 2.5 Materialien

### 2.5.1 Chemikalien und Reagenzien

Material	Hersteller
10x Loading Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Propanol 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Xylen Cyanol FF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Bio-Rad, Hercules, USA
Bovin Serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Merck, Darmstadt
Ammonium Persulfat	Bio-Rad, Hercules, USA

<b>SDS</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>TEMED</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Ponceaurot</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Phosphatgepufferte Salztabletten</b>	Life Technologies, Carlsbad, USA
<b>DEPC-behandeltes Wasser</b>	Invitrogen, Camarillo, USA
<b>Essigsäure 100 %</b>	Merck, Darmstadt
<b>Salzsäure 25 %</b>	Merck, Darmstadt
<b>Ethanol denaturiert 95 %</b>	VWR, Darmstadt
<b>Ethanol pro analysi 100 %</b>	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
<b>Natronlauge (2 mol/l)</b>	Merck, Darmstadt
<b>SDS Lösung (10 % w/v)</b>	Promega, Madison, USA
<b>Natriumdesoxycholat</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Borsäure 99,5 %</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>EDTA (0,5 M)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Igepal CA-630</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>2-Mercaptoethanol (98 %)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Natriumchlorid</b>	Merck, Darmstadt
<b>SDS zur Elektrophorese (99 %)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Tris Base (Trizma<sup>®</sup> base)</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Triton X 100</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<b>Acrylamid/Bis Lösung 29:1 (30 %)</b>	Bio-Rad, Hercules, USA

## 2.5.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Amersham Hybond blotting paper</b>	GE Healthcare, München
<b>Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane</b>	GE Healthcare, München
<b>Amersham Hyperfilm ECL</b>	GE Healthcare, München
<b>Falcon Rundbodenröhrchen (5 ml)</b>	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
<b>Kryo-Tubes (1,8 ml)</b>	Nunc, Roskilde, Dänemark
<b>PCR iCycler PCR Plates, 96 wells</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>PCR Sealers Microseal 'B' Film</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)</b>	VWR, Darmstadt
<b>Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Serologische Pipetten Falcon (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)</b>	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
<b>Short und Spacer Glasplatten Mini-Protean 3</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Thermo-Tube (0,2 ml)</b>	Abgene House, UK
<b>Wägeschälchen Diamant (25 ml)</b>	VWR, Darmstadt
<b>Zentrifugenröhrchen mit Schraubkappen (15 ml, 50 ml)</b>	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Pasteurpipetten</b>	VWR, Darmstadt
<b>96-Well Assay-Platten (Proteinbestimmung)</b>	Nunc, Roskilde, Dänemark

### 2.5.3 Pufferlösungen und biochemische Kits

Pufferlösungen	Zusammensetzung
<b>PBS</b> (pH uneingestellt bei ca. 7,4)	137 mM NaCl, 2,7mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,46 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>0,05 % PBS-Tween (PBS-T)</b> (pH uneingestellt bei ca. 7,4)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,46 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,05 % TWEEN® 20
<b>TBE-Puffer</b> (pH uneingestellt bei ca. 8,0)	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
<b>Towbin-Puffer</b> (pH uneingestellt bei ca. 8,3)	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 20 % Methanol
<b>RIPA-Puffer</b> (pH eingestellt bei ca. 7,5)	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % Igepal 40, 0,5 % Natrium-Desoxycholat, 0,1 % SDS
<b>Ponceaurot-Lösung</b>	0,1 % Ponceaurot, 0,5 % Essigsäure, 100 ml H <sub>2</sub> O

Kit	Hersteller
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Qiagen, Hildensung
<b>Reverse Transcription System</b>	Promega, Madison, USA
<b>DC™ Protein Assay (Reagenz A, B, S)</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Amersham ECL Detection Reagent</b>	GE Healthcare, München

Hormonassay	Hersteller
<b>DSL-410 (Testosteron)</b>	Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim
<b>DB52021 (5<math>\alpha</math>-Dihydrotestosteron)</b>	IBL, Hamburg
<b>Coat-A-Cont TKAL1 (Aldosteron)</b>	Siemens Healthcare, Erlangen

### 2.5.4 Geräte

Material	Hersteller
<b>Analysenwaage Sartorius BP 121 S</b>	Sartorius, Göttingen
<b>Analysenwaage Scout Pro</b>	Ohaus, Nänikon, Schweiz
<b>Belichtungskassette 8 x 10 Zoll</b>	Appligene, Watford, UK
<b>Blutdruckmonitor, nicht-invasiv</b>	TSE-Systems, Bad Homburg
<b>Zentrifuge 5415C</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Elektrophorese Kammer MGU-302</b>	C.B.S. Scientific Co., Del Mar, USA
<b>Galaxy Mini Star Tischzentrifuge</b>	VWR, Darmstadt
<b>Genesys 10 UV Scanning</b>	Thermo Spectronic, Wuppertal
<b>Heizblock Thermomixer 5436</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>iMark Microplate Absorbance Reader</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Kodak X-OMAT Multiloader 300 Plus</b>	Kodak AG, Stuttgart
<b>LabSonic Ultraschallhomogenisator</b>	Sartorius, Göttingen
<b>Mikrowellenofen Micromaxx MM41580</b>	Medion, Essen
<b>Millipore-Ionenaustauscheranlage Milli-Q</b>	Millipore, Schwalbach
<b>Mini Protean 3 Zell Elektrophorese Kammer</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Mini Vortexer</b>	VWR, Darmstadt
<b>Model 1000/500 Power Supply</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Model 200/2.0 Power Supply</b>	Bio-Rad, Hercules, USA
<b>Motorhandstück MHX (E)</b>	Xenox, Wecker, Luxemburg
<b>MR 3002 (Magnetrührer)</b>	Heidolph, Schwabach
<b>NanoDrop 1000</b>	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

pH 211 Microprocessor (pH-Meter)	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Pipette Eppendorf research 0,1- 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Eppendorf (Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments, Schwabach
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Typhoon 8600 Variable Mode Imager	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK

## 2.6 Methoden

### 2.6.1 Blutdruck- und Nierengewichtsmessung

Der systolische Blutdruck wurde nicht-invasiv mittels der „Tail-cuff-Methode“ (Blood Pressure Monitor, Nicht-invasiv – 209002 Serie, 4-Kanal-System, TSE Systems GmbH, Bad Homburg) gemessen. Diese Messung erfolgte am wachen Tier unter Anwendung einer Druckmanschette am Schwanz des Tieres. Um zirkadiane Fluktuationen des Blutdrucks zu minimieren, wurden jeweils fünf wiederholte Blutdruckmessungen pro Tier gemittelt. Das Nierengewicht wurde nach Tötung der Tiere bestimmt. Hierzu wurden beide Nieren pro Tier entnommen und jeweils zusammen mit einer elektronischen Feinwaage (A120S-D1; Sartorius, Göttingen) gewogen [85].

### 2.6.2 Bestimmung der Hormonkonzentration im Serum

Des Weiteren wurden für Testosteron, 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron und Aldosteron die Konzentration im Serum ermittelt. Dies erfolgte mit kommerziellen Assays für die jeweiligen Hormone. So wurde für Testosteron nach Herstelleranleitung ein Radioimmunoassay (DSL-4100, Diagnostic Systems Laboratories Deutschland GmbH, Sinsheim), für 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron nach Herstelleranleitung ein Enzymimmunoassay (DB52021, IBL International GmbH; Hamburg) und für Aldosteron nach Herstelleranleitung ein Radioimmunoassay (Coat-A-Cont Aldosterone RIA TKAL1, Siemens Healthcare, Erlangen) verwendet [85].

### 2.6.3 RNA-Extraktion aus Nierengewebe

Die RNA-Extraktion erfolgte über Anionenaustauschersäulen nach Herstellerangaben (RNeasy Mini Kit, Qiagen).

Zur Vorbereitung wurde zunächst ca. 30 mg Nierengewebe in 700 µl RLT-Puffer (RLT-Buffer aus dem Kit +  $\beta$ -Mercaptoethanol) lysiert und anschließend das Gemisch mittels Xenox-Motorhandstück in Kryptubes auf Eis homogenisiert. In mehrfachen Schritten wurde das nun von RNase inaktivierte und lysierte Gemisch unter Zugabe von 70 %-igem Ethanol auf die Rneasy Mini-Säulen gegeben. Die stark geladene RNA bindete dabei an die Säulenmembran, während die weniger stark geladenen Proteine die Membran durchlaufen. Durch anschließende Zentrifugation der Säule nutzt man zusätzlich die Mikrospin-Technologie zur weiteren Aufreinigung. Des Weiteren wurde in nacheinander folgenden Schritten RW1- und RPE-Puffer auf die Säule aufgetragen und jeweils zentrifugiert, um so die totale RNA-Bindung an die Säulenmembran zu optimieren und vom restlichen Material auszuwaschen.

Im letzten Schritt wurde die aufgereinigte RNA in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert und zur Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.6.4 Qualitätsprüfung der extrahierten RNA

Zur Beurteilung der Genexpression ist die Quantität und Qualität der Ausgangs-RNA von ausschlaggebender Relevanz. So wird besonders die quantitative (Echtzeit-)PCR (qPCR) von der Integrität und Qualität der RNA beeinflusst.

Im Folgenden wurden zur Verifizierung der Qualität und Integrität der RNA zwei gängige Methoden angewandt.

#### 2.6.4.1 Qualitative Bewertung

Zunächst wurde ein 1 %-iges Agarosegel mit Hilfe von 40 ml TBE-Puffer und 0,4 g Agarose hergestellt. Als fluoreszierender Farbstoff wurde diesem SYBR<sup>TM</sup> Safe (Invitrogen), der die Eigenschaft hat RNA zu binden, zugesetzt. Nach Auftragen der Ficoll-zugesetzten Proben in die vorgegebenen Taschen des Agarosegels wurden die Nukleinsäure-Moleküle mittels Elektrophorese für ca. 1 h bei 70 V in Banden

aufgetrennt. Dabei wandern die Moleküle nach ihrer Größe und elektrischen Ladung in einem elektrischen Feld. Je kleiner das molekulare Gewicht und je stärker die Ladung des Fragments ist, desto schneller kann es in dem Netz des Agarosegels wandern. Mit Hilfe des Typhoon Laser Scanners konnten unter UV-Fluoreszenz für alle Proben zwei Banden, die der 18S und 28S Untereinheit der RNA entsprechen, detektiert werden. Diese Methodik bestätigte somit die Unversehrtheit der RNA-Konzentration.

#### 2.6.4.2 *Quantitative Bewertung*

Hierbei wurde mittels der optischen Dichte (OD) die Konzentration im NanoDrop-Spektrophotometer bestimmt. Die Spektrophotometer-Software nutzt die optische Dichte der Probe bei 260 nm, eine Verdünnungsreihe und einen spezifischen Multiplikationsfaktor für RNA, um mittels des Lambert-Beerschen-Gesetzes die RNA-Konzentration zu berechnen. Das Verhältnis aus der  $OD_{260nm}$  und  $OD_{280nm}$  ist außerdem ein Indikator für die Proteinkontamination und sollte für RNA bei  $\sim 2,0$  liegen, um eine gute qPCR zu gewährleisten. So wurden für die weiterführenden Versuche RNA mit einer OD-Ratio von 1,9 bis 2,1 verwendet.

#### 2.6.5 **cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese kann mit verschiedenen Reverse Transkriptase(RT)-Enzymen, die mit unterschiedlicher enzymatischer Aktivität arbeiten, erfolgen. Es handelt sich um RNA-abhängige DNA-Polymerasen, welche aus einer einzelsträngigen RNA zunächst einen RNA-DNA-Hybridstrang katalysieren. Des Weiteren ist das Enzym für den darauffolgenden Abbau des RNA-Anteils verantwortlich, um dann in einem zweiten Schritt durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptase einen vollständigen DNA-Strang herzustellen.

Bei der vorliegenden RNA aus Nierengewebe wurde dabei das Reverse Transcription Kit (PROMEGA) verwendet und nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Dabei wurden zunächst die vorliegenden RNA-Proben mit RNase-freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 2  $\mu$ g gebracht und dann für 10 min bei 70 °C denaturiert. Hier wurde ihre Sekundärstruktur aufgelöst. Anschließend erfolgte die RNA-DNA-

Hybridisierung mit einem für alle RNA-Proben gleich angesetzten Mastermix wie in Tab. 1 angegeben. Während der Inkubation der Proben für 10 min bei Raumtemperatur und 15 min bei 42 °C erfolgte die weitere Umschreibung der RNA in einen vollständigen DNA-Strang. Im Anschluss wurden die Proben für 5 min bei 95 °C gehalten, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Nach kurzem Abkühlen der Proben wurden diese aliquotiert und bei -20 °C eingefroren (Tab. 1).

RNA + H <sub>2</sub> O-Gemisch			Reverse Transkriptase Mastermix		
Reagenzien	Volumen	Gesamt-konzentration	Reagenzien	Volumen	Gesamt-konzentration
DEPC-H <sub>2</sub> O	Variabel (Spezifisches Volumen für 2 µg)		MgCl <sub>2</sub>	8,0 µl	5 mM
			RT 10 x Puffer	4,0 µl	1 x
			dNTP Mix	4,0 µl	1 mM
RNA	Variabel (Spezifisches Volumen für 2 µg)	9,75 µg/µl	Recombinant RNasin®	1,0 µl	1 u/µl
			AMV-RT	1,5 µl	15 u/µg
			Random Primers	2,0 µl	1 µg/µl
Gesamt	19,5 µl		Gesamt	20,5 µl	

**Inkubation des RNA/H<sub>2</sub>O-Gemisches:  
10 min bei 70 °C, danach auf Eis**

↓

+

↓

RNA-Vorlage Gesamtvolumen	40 µl	
Zyklen der cDNA-Synthese	10 min bei Raumtemperatur	Zusätzliche Extension der Primer
	15 min bei 42 °C	Reverse Transkription
	5 min bei 95 °C	Inaktivierung der AMV-RT
	5 min auf Eis	Lagerung bei -20 °C

**Tab. 1: Pipettierschema und reverse Transkription der isolierten RNA aus Nierengewebe.**

### 2.6.6 Konventionelle PCR

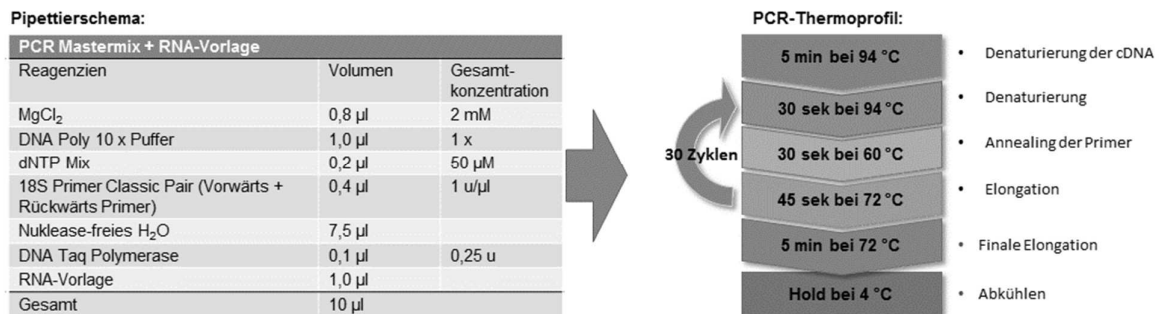
In nachfolgenden Versuchen sollte eine mögliche Verunreinigung der cDNA-Proben und der Nachweis von 18S ribosomaler RNA (rRNA) mit Hilfe der konventionellen PCR überprüft werden. Diese dient dem Nachweis von DNA-Fragmenten und kann durch exponentielle Vervielfältigung schon geringe Mengen spezifisch nachweisen.

Dabei muss das nachzuweisende Fragment und dessen Struktur bekannt sein. Zur Vervielfältigung nutzt man Primer, welche kurze komplementäre DNA-Fragmente zum nachzuweisenden DNA-Stück sind und diese an einer bestimmten Stelle binden, um die Verdoppelung mit Hilfe eines Enzyms, der Taq-Polymerase, in Gang zu setzen. Die Taq-Polymerase stammt von einem thermophilen Bakterium und ist auch bei hohen Temperaturen sehr stabil. Sie bleibt selbst beim Denaturierungsprozess der DNA bei ca. 95 °C funktionstüchtig. So wird zunächst die cDNA bei ca. 95 °C in zwei



Einzelstränge aufgespalten (Denaturierung). Daraufhin können sich die spezifischen Primer, kurze synthetische DNA-Fragmente des bekannten Genabschnitts, an den komplementären Einzelstrang anheften (Annealing). Diese sind dann der Startpunkt für die weitere DNA-Replikation mit Hilfe der DNA-abhängigen Taq-Polymerase und synthetisieren den komplementären Strang (Elongation). Wiederholt man diesen Zyklus von Denaturierung, Annealing und Elongation, hat man schon geringe Mengen eines bestimmten Genfragments exponentiell vervielfältigt. Dabei ist die Temperatur der einzelnen Schritte abhängig von der Länge und der Basenstruktur des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der verwendeten Primer.

Zunächst wurde den cDNA-Proben jeweils ein Mastermix mit freien Nukleotiden, synthetisch hergestellten Primern und das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase hinzugegeben (Tab. 2). Im Anschluss durchliefen die Proben im PCR-Thermocycler mehrere Zyklen des sich in Tab. 2 dargestellten Protokolls.



**Tab. 2: Pipettierschema und Thermoprofil für die Polymerasekettenreaktion.**

### 2.6.6.1 Beurteilung der PCR-Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Um nun PCR-Produktspezifität zu überprüfen, kam die Agarose-Gelelektrophorese zur weiteren Anwendung. Dabei wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel durch Erhitzen von Agarose in TBE-Puffer und Hinzufügen des Fluoreszenzfarbstoffs CYBR™ Safe hergestellt. Anschließend konnte in einer Biometra-Agagel-Apparatur die Elektrophorese stattfinden. Dazu wurden in die Taschen des ausgekühlten Gels je 9 µl eines Amplifikats, das zuvor mit einem 10-fachen Probenpuffer verdünnt wurde, hineinpipetiert. Zusätzlich wurde jedem Gel eine Tasche mit 9 µl Negativkontrolle in

Form von RNase-freiem Wasser (DEPC-behandeltes Wasser) in 10-fach verdünntem Probenpuffer mitgeführt. Ebenfalls wurde ein Molekulargewichtsstandard (HyperLadder™) aufgetragen. Im Laufpuffer (TBE-Puffer) wanderten anschließend die negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld bei 90 V für ca. 90 min zur Anode. Hierbei wurden die Moleküle der Größe und der Ladung nach aufgetrennt und bildeten Banden. Über den aufgetragenen Molekulargewichtsstandards konnte das Amplifikat einer Größe zugeordnet werden. Die fluoreszierenden DNA-Banden wurden mittels Typhoon Laser Scanner detektiert. Zur weiteren Verwendung kamen nur Proben, die eindeutig das 18S-Fragment nachwiesen und keine Verunreinigung durch zusätzliche Banden zeigten.

## 2.6.7 Quantitative PCR

### 2.6.7.1 Die quantitative PCR (qPCR)

Das Funktionsprinzip der qPCR ähnelt der konventionellen PCR mit den Schritten der Denaturierung, des Annealings und der Elongation pro Zyklus. Im Unterschied zur konventionellen PCR kann die amplifizierte DNA jedoch quantifiziert werden. Bei dieser Vervielfältigungsmethode wird mit Hilfe eines zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffes, welcher an den zu amplifizierenden Genabschnitt bindet, die Intensität am Ende eines jeden Zyklus gemessen. Die Fluoreszenzintensität nimmt proportional zur Zahl der DNA-Transkripte zu. So wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale in der exponentiellen Wachstumsphase die Quantifizierung vorgenommen. Für das Annealing wurden Primer und Sonden für 18S rRNA (von Applied Biosystems) erworben. Weitere Primer und Sonden für den MR, GR und TGF- $\beta$ 1 wurden als vorgefertigte „Assays on Demands“ der Spezies Ratte (von Applied Biosystems) erworben.

Auf 96-Well-Platten wurden alle Proben in Triplets gemessen. Außerdem erfolgten die Messungen in zweifachem Turnus. Des Weiteren ermöglichte das Multiplex-Verfahren in demselben Durchgang die Untersuchung sowohl des „Housekeeping“-Gens als auch des Zielgens, welche durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe markiert wurden. Hierbei wurde für die 18S rRNA Sonde der Farbstoff VIC® und für die „Assays on Demand“ der Farbstoff FAM™ verwendet. Als „Housekeeping“-Gen bezeichnet man in der PCR-Analyse ein nicht-reguliertes Gen, welches zur Normalisierung der zu

untersuchenden Zielgene herangezogen werden kann. Dies ist möglich, weil die Expression des Housekeeping-Gens unbeeinflusst von der Behandlung stattfindet. Ein 25 µl-Well enthielt Taqman® Universal PCR Master Mix, Vorwärts-/Rückwärts-Primermix für 18S rRNA, „Assay on Demand“ und jeweils 25 ng cDNA-Vorlage (Tab. 3). Aus einem Pool der Proben wurde eine Verdünnungsreihe von 0,17 ng–25,0 ng in Duplikaten zu jedem PCR-Durchlauf gemessen, um eine Standardkurve für die Quantifizierung zu ermitteln. Zusätzlich wurde bei jeder durchgeführten PCR eine Negativkontrolle in Form von H<sub>2</sub>O als Vorlage gemessen.

Die Echtzeit-PCR wurde mit Hilfe des iCycler MyiQ™ 2 Two-Color (Bio-Rad) ausgeführt und beinhaltete untenstehendes Thermoprofil. Alle Gene wurden in 44 Zyklen amplifiziert.

Pipettierschema:		PCR-Thermoprofil:	
Mastermix + cDNA-Vorlage			
Reagenzien	Volumen	2 min bei 50 °C	• Stabilisierung bei Fluktuationen der Fluoreszenz
Taqman® Universal Mastermix	12,5 µl	10 min bei 95 °C	• Einleitende Denaturierung der cDNA-Vorlage
Taqman® „Assay on Demand“	1,25 µl	15 sek bei 95 °C	• Denaturierung
18S Vorwärts Primer	0,125 µl	60 sek bei 60 °C	• Kombiniertes Primerannealing/-elongation
18S Rückwärts Primer	0,125 µl	Hold bei 4 °C	• Abkühlen
18S Probe	0,125 µl		
DEPC-H <sub>2</sub> O	9,875 µl		
cDNA-Vorlage	1,0 µl		
Gesamt	25 µl		

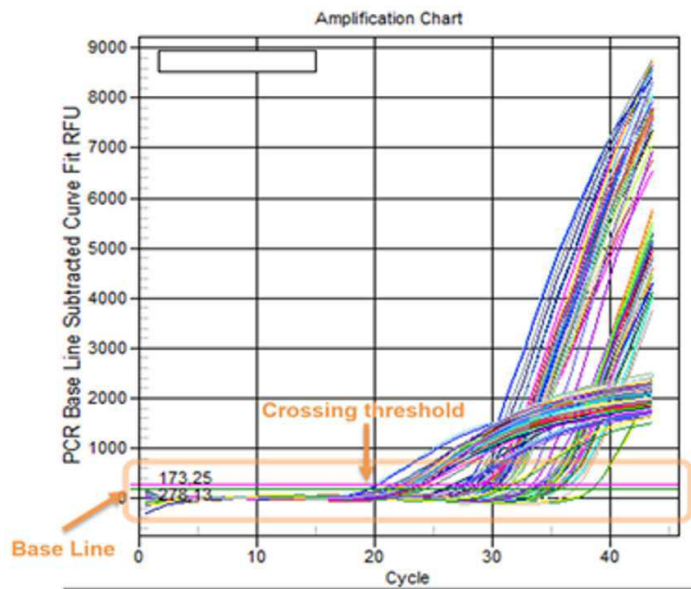
Tab. 3: Pipettierschema und Thermoprofil der qPCR.

### 2.6.7.2 Auswertung der qPCR-Daten

Die erhaltenen Daten der qPCR-Durchläufe wurden mittels der iQ™ 5 Optical System Software als Amplifikationskurven dargestellt (Abb. 4). In dieser Kurve werden die PCR-Zyklen auf x-Achse und die Fluoreszenzintensität des amplifizierten Produkts in den Proben auf der y-Achse dargestellt. Hierbei ist die Fluoreszenzintensität zur Menge der amplifizierten Gene proportional.

Die Quantifizierung der qPCR Daten erfolgte anhand von Ct-Werten („Crossing threshold“). Sie entsprechen der Anzahl der qPCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Hierbei zeigt die Graphik zwei unterschiedliche Phasen der qPCR-Kurve an: eine exponentielle Wachstumsphase und nicht-exponentielle Plateauphase. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich

das qPCR-Produkt mit jedem Zyklus. Während die qPCR voranschreitet, werden die Reaktionskomponenten nach und nach verbraucht und die Plateauphase setzt ein.

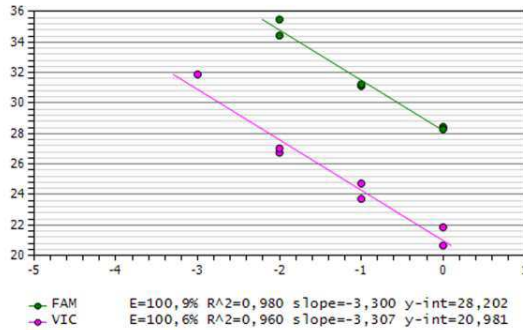


**Abb. 4:** Typische Amplifikationskurven nach qPCR-Durchlauf im MyiQ™2-Cyclers. y-Achse = Fluoreszenzsignal, x-Achse = PCR-Zyklus

Zunächst wird in der exponentiellen Phase trotz exponentieller Zunahme des Amplifikats kein Fluoreszenzsignal detektiert (Zyklus 1-20, Abb. 4). Dies wird als Hintergrundrauschen bezeichnet. Wenn genügend amplifizierte Menge des Produkts vorliegt, wird das Fluoreszenzsignal registriert.

In der qPCR-Kurve wurde zur Auswertung die Grundlinie („Base Line“) auf Höhe des ausgewählten Fluoreszenzsignals der y-Achse, an dem alle Proben einen ersten deutlichen Anstieg zeigten, parallel zur x-Achse gesetzt. Der Schnittpunkt entspricht dann dem „Crossing threshold“, an dem optimalerweise eine maximale PCR-Effizienz vorliegt.

Die maximale PCR-Effizienz bei 100 % entspricht einer Verdopplung des Amplifikats nach jedem Zyklus und somit des Fluoreszenzsignals. Die Bestimmung der PCR-Effizienz wurde zu jedem qPCR-Durchgang wiederholt. Hierzu wurde eine Standardkurve aus einem cDNA-Pool ermittelt. Aus dem cDNA-Pool der Proben wurde eine Verdünnungsreihe 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 gebildet und in Duplikaten gemessen. Die iQ™ 5 Optical System Software berechnet dann aus der Korrelation zwischen dem Logarithmus der eingesetzten cDNA-Mengen und den Zykluszahlen (Ct-Werte) eine lineare Regressionsgerade, welche sich reziprok logarithmisch verhält (Abb. 5).



**Abb. 5: Darstellung einer Standardkurve und PCR-Effizienzbestimmung.** Berechnung anhand einer Verdünnungsreihe sowohl für das Housekeeping-Gen (VIC) als auch für das Zielgen (FAM). Idealerweise liegen die Punkte auf der Geraden. y-Achse = Zyklen, x-Achse = cDNA-Menge

Ein niedriger Ct-Wert spiegelt eine hohe Ausgangsmenge und umgekehrt ein hoher Ct-Wert eine niedrige Ausgangsmenge wider. Die Effizienz E wird dementsprechend aus der Steigung („slope“) der Standardkurve berechnet.

$$E = 10^{-1/Steigung}$$

$$\% E = (1 - E) \times 100 \%$$

Diese Methode weist jedoch erhebliche Mängel aufgrund der Mischprobe an cDNA auf und überschätzt zumeist die eigentlich PCR-Effizienz [87]. Um Störfaktoren wie diese und zum Beispiel auch Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA oder Effizienz der cDNA-Synthese zu umgehen, ist die Methode der Normalisierung auf ein Referenzgen (Housekeeping-Gen) derzeit gebräuchlich. Das hier gewählte Berechnungsmodell der relativen Quantifizierung erfolgte nach LIVAK UND SCHMITTGEN [88], bei der die Daten als n-fache Änderung der Genexpression normalisiert auf ein endogenes Housekeeping-Gen und relativ zur unbehandelten Kontrollgruppe kalibriert werden:

$$Rel. Genexpression = 2^{-[(Ct_{ZG} - Ct_{HKG})_{Behandlung} - (Ct_{ZG} - Ct_{HKG})_{Kontrolle}]}$$

Dabei wurde im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Housekeeping-Gens ( $Ct_{HKG}$ ) vom Zielgen ( $Ct_{ZG}$ ) subtrahiert und der sogenannte  $\Delta Ct$  gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert für die Messwerte einer Probe berechnet.

$$\Delta Ct = Ct_{ZG} - Ct_{HKG}$$

Anschließend wurden die einzelnen  $\Delta Ct$ -Werte auf den Mittelwert (M) der  $\Delta Ct$ -Werte der unbehandelten Gruppe (Kontrolle) kalibriert und als  $\Delta\Delta Ct$  angegeben.

$$Kalibrierung \ \Delta\Delta Ct = \frac{\Delta Ct}{M(Ct_{ZG} - Ct_{HKG})_{Kontrolle}}$$

$$Rel. Genexpression = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## 2.6.8 Western Blot

Unter Western Blotting versteht man das Verfahren zur Übertragung von Proteinen auf eine Membran nach gelelektrophoretischer Trennung. Hierzu wurde das „Semi-dry“-Verfahren angewendet, wobei eine Art „Sandwich“ aus Gel, Membran und puffergetränkten Filterpapieren zwischen zwei flache Elektroden gesetzt wird. Das elektrische Feld bewirkt, dass die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen werden. Anschließend folgt der Immunoblot zum Nachweis bestimmter Proteine. Hierzu wird die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Die weitere Inkubation erfolgt mit einem sekundären Antikörper, welcher den spezifischen Antikörper bindet, und somit eine Farbreaktion auslöst. So kann das gesuchte Protein gezielt nachgewiesen werden.

### 2.6.8.1 Proteinextraktion aus Nierengewebe

Für die Proteinextraktion wurde zunächst ein Probenpuffer, bestehend aus RIPA-Puffer und cOmplete™ Mini Proteasehemmer-Cocktail (ROCHE), angesetzt. Auf 10ml RIPA-Puffer wurde eine Tablette cOmplete™ Mini hinzugefügt.

Unter Kühlung auf Eis wurden 450 µl des Probenpuffers in 2 ml-Ultrazentrifugenröhrchen abgefüllt. Je Röhrchen wurde ca. 40 µg Nierengewebe hinzugefügt. Mittels Xenox-Handmotor wurde das Lysat homogenisiert. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurden die Proben für ca. 30 s sonifiziert und anschließend für 10 min bei 20.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

Anschließend konnte der Überstand, welcher das extrahierte Protein beinhaltet, abpipettiert und in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert werden. Diese wurden zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Bei der kompletten Prozessierung des Nierengewebes wurde auf Eis gearbeitet, um eine Proteaseaktivität zu vermeiden.

### 2.6.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben erfolgte nach der Bradford-Methode [89]. Hierzu wurde der Biorad DC™ Protein Assay genutzt. Die Proben wurden mit dem im Assay enthaltenen Bradford-Lösungen, welche den

Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) enthalten, auf eine 96-well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Der Farbstoff CBBG bindet das Protein und ändert seine Farbintensität äquivalent zum Proteingehalt. Parallel hierzu wurde eine Standardreihe bovines Serumalbumins (BSA) hergestellt und ebenfalls auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Diese wurde dann 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Extinktion mittels Photometer bei dem Absorptionsmaximum des CBBGs bei 750 nm gemessen. Anhand der BSA-Eichkurve konnte mit Hilfe der integrierten Software im Photometer die Proteinkonzentration berechnet werden. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde eine Konzentration entsprechend 30 µg Gesamtprotein aus den Nierenproben verwendet.

### 2.6.8.3 SDS-Gelelektrophorese und Proteintransfer

Zur optimalen Auftrennung des MR- und GR-Proteins zwischen 80–110 kDa wurde ein SDS-Gel hergestellt, bestehend aus 5 %-igen Sammelgel und 12 %-igen Trenngel (Tab. 4). Die Probenvolumina wurden für 30 µg Nierengewebe berechnet. Diese wurden im Verhältnis 1:5 Probenpuffer (Thermoscientific – Lane Marker Sample Reducing Buffer) und Millipore-Wasser hinzugefügt und für 5 min im Heizblock bei 95 °C inkubiert.

Trenngel, 12 % Gel		Sammelgel, 5 % Gel	
Acrylamid-Lösung	4,0 ml	Acrylamid-Lösung	0,83 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,63 ml
1,5 % Ammoniumpersulfat	0,1 ml	1,5 % Ammoniumpersulfat	0,05 ml
10 % SDS	0,1 ml	10 % SDS	0,05 ml
H <sub>2</sub> O (Millipore)	3,3 ml	H <sub>2</sub> O (Millipore)	3,4 ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,005 ml

Tab. 4: Zusammensetzung des Trenngels und Sammelgels für die SDS-Gelelektrophorese.

Nach Polymerisierung des Gels wurden die Geltaschen mit jeweils 19 µl einer Probe bzw. eine Tasche mit 8 µl Proteingrößenmarker befüllt (Bioline – Hyper Page II). In dem Laufpuffer (Tris Base, Glycin, SDS und H<sub>2</sub>O) wanderten die geladenen Proteine anschließend in einem elektrischen Feld bei 70 V für ca. 20 min und bei 130 V für weitere 90 min in Richtung Anode.

Nachfolgend fand der Transfer der aufgetrennten Proben vom Gel auf eine PVDF-Membran nach der „Semi-dry“-Methode statt. Zunächst wurde das Gel in Millipore-Wasser gewaschen, parallel hierzu wurden die Membran und Filterpapier in Transferpuffer (Towbin), der Methanol enthält, eingetaucht. Dies diente der Entfernung von Verunreinigungen auf der Membran und den speziellen Filterpapieren für die Sandwich-Blot-Methode. In einem Trägerschlitten wurden daraufhin drei befeuchtete Filterpapiere aufgelegt, darauf die Membran und auf der Membran das ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtete SDS-Gel. Auf das Gel wurden abschließend wieder drei Schichten feuchtes Filterpapier gelegt. Daraufhin konnte die Transferkammer geschlossen und der Transfer in einem gerichteten elektrischen Feld bei 100 mA pro Membran für ca. zwei Stunden durchgeführt werden.

Nach erfolgtem Transfer wurde das Gel und das Blottingpapier entsorgt und das nun übertragene Protein auf der Membranoberfläche vorsichtig mit Millipore-Wasser gewaschen. Zusätzlich wurde die proteinbeladene Oberfläche gekennzeichnet.

#### *2.6.8.4 Prüfen des Proteintransfers*

Mit Hilfe der Ponceaurot-Färbelösung wurde unter temporärer Färbung der Blotmembran der Proteintransfer nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran für ca. 1 min in Ponceaurot-Färbelösung geschwenkt und anschließend mit Millipore-Wasser ausgewaschen. So wurden die Proteinbanden rötlich angefärbt. Daraufhin konnte die Blotmembran bei ca. 60 kDa vorsichtig mit einem Skalpell in zwei Hälften geteilt werden. Die Hälften wurden parallel weiterbehandelt, um das Zielprotein und Referenzprotein (MR/GR bei ca. 100 kDa,  $\beta$ -Actin bei ca. 40 kDa) unterschiedlicher Größe zu markieren und detektieren.

#### *2.6.8.5 Markierung mit Antikörper*

Nach erfolgreichem Proteintransfer wurde die nun in zwei Hälften geteilte Membran mittels 5 %-iger PBS-T-Magermilch-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Hiernach erfolgten drei Waschgänge mit PBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.



Daraufhin wurde der primäre Antikörper des nachzuweisenden Proteins, verdünnt in PBS-T, auf die Membran aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert:

- *Anti-MR: 1:1000 in 50 mM Tris (pH 7,4),*
- *Anti-GR: 1:1000 in 50 mM Tris (pH 7,4),*
- *Anti-β-Actin: 1:2000 in PBS-T.*

Am folgenden Tag wurden wieder drei Waschgänge mit PBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt, um dann die Membranhälften mit dem sekundären Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBS-T zu benetzen. Hierbei kamen unterschiedliche Sekundär-Antikörper abhängig der Spezies des Primär-Antikörpers zum Einsatz. Der Sekundär-Antikörper wurde für zwei Stunden unter ständigem Schwenken auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert.

- *Anti-Maus-IgG HRP (Membran mit anti-MR): 1:2000 in 1 % BSA, 0,5 % Magermilch in PBS-T,*
- *Anti-Kaninchen-IgG HRP (Membran mit anti-GR): 1:2000 in 1 % BSA, 0,5 % Magermilch in PBS-T,*
- *Anti-Maus-IgG HRP (Membran mit anti-β-Actin): 1:5000 in 1 % BSA, 0,5 % Magermilch in PBS-T.*

Nachfolgend wurden drei Waschgänge zu je 10 min in PBS-T auf dem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 2.6.8.6 Chemilumineszenz und Proteindetektion

Der Immunoblot wurde mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar gemacht. Hierzu wurden ECL Detection Solution Reagent I und II im Verhältnis 1:1 vermischt, hiermit jeweils die Proteinseite der Membranen benetzt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Membranhälften unter eine Klarsichtfolie zusammengelegt und in eine Filmkassette gegeben, wobei die Proteinseite zur Klarsichtfolie hinzeigte. Die überschüssige Chemilumineszenzlösung und Luftblasen wurden vorsichtig durch Ausrollen auf der Klarsichtfolie und Löschpapier beseitigt.

Nun konnte die Membran auf einem Röntgenfilm, welcher unter Abdunkelung auf die Klarsichtfolie gebracht wird, für unterschiedliche Zeit in einer Filmkassette exponiert und anschließend mit dem Kodak X-OMAT Multiloader 300 Plus entwickelt werden. Mittels mitgeführten Molekularstandard konnte das Protein visuell detektiert werden.

#### 2.6.8.7 Gelbeladungskontrolle

Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu prüfen, wurde das 42 kDa große  $\beta$ -Actin als Referenzprotein detektiert. Aufgrund der Proteingewinnung aus Gewebe, wo die Zellzahl und -größe variieren können, diente dies der Kontrolle der Proteinmenge. Das  $\beta$ -Actin kommt in allen Zelltypen vor und sollte von experimentellen Einflüssen unbeeinflusst bleiben. Eine gleichmäßige  $\beta$ -Actin-Bande wurde somit als Voraussetzung für die Interpretation der durchgeführten Western Blots festgelegt. Des Weiteren kann  $\beta$ -Actin als Referenzprotein zur relativen Quantifizierung des gesuchten Proteingehalts pro Probe herangezogen werden. Zur repräsentativen Darstellung der Proteinexpression in der vorliegenden Arbeit wurde die Durchführung eines singulären Laufs pro Probe gewählt. Somit wurde auf eine quantitative Auswertung der Western Blots verzichtet.

#### 2.6.9 Statistische Auswertung, Software

Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Tests für die Varianzanalyse bei Blutdruck, Nierengewicht sowie Hormonkonzentrationen erfolgte nach Prüfung auf Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests. Anschließend wurde die statistische Auswertung auf Signifikanz mit GraphPad Prism 5.0 durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Korrektur bzw. durch den *Student's t*-Test zum Vergleich einzelner Subgruppen durchgeführt. Ergebnisse mit einem p-Wert  $< 0,05$  wurden als signifikant und einem p-Wert  $< 0,01$  wurden als hochsignifikant gewertet.

Die statistischen Korrelationsanalysen der qPCR erfolgte mit REST-2009<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden). Diese Software berücksichtigt die Abweichungen der mittleren  $\Delta\Delta$  Ct-Werte zwischen Behandlungsgruppe und Kontrollgruppe. Es werden alle Werte als Mittelwert der  $\Delta\Delta$  Ct-Werte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Danach werden die

Ergebnisse der Expressionsratio auf Signifikanz mittels eines paarweise korrigierten Umverteilungs-Randomisierungstests [90] geprüft. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant und einem p-Wert < 0,01 wurden als hochsignifikant gewertet.

	<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>RNA-Analyse</b>	Nanodrop 1000 Spectrophotometer Software	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
<b>PCR-Analyse</b>	iQ™ 5 Optical System Software	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<b>Protein-Analyse</b>	Microplate Manager® Software 6.1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<b>Datenerfassung</b>	MS Excel™ 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<b>Statistik</b>	REST-2009®	Qiagen, Hilden
	GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
<b>Grafik</b>	GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software, San Diego, USA
	MS Powerpoint™ 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<b>Textverarbeitung</b>	MS Word™ 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
<b>Literaturverzeichnis</b>	EndNote X7	Niles & Associates Inc., New York City, USA

**Tab. 5: Softwarenutzung für die Datenauswertung und -darstellung.**

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phänotypisierung der Versuchstiere

Fokus dieser Arbeit ist die Untersuchung der renalen MR- und GR-Regulation durch Androgene und in Gegenwart unterschiedlicher Kochsalzbelastungen, da diese einen entscheidenden Einfluss auf den Blutdruck nehmen. Um den klinischen Zusammenhang für dieses Studiendesign zu verifizieren, wurden der Blutdruck und das relative Nierengewicht am Tag der Tötung untersucht. Das relative Nierengewicht ist hierbei von Interesse, weil Androgenwirkungen, renale Umbauprozesse und ein Anstieg des Blutdrucks eng miteinander assoziiert sind. Auch eine durch Androgene bedingte Nierenhyperplasie ist bekannt.

#### 3.1.1 Androgensubstitution nach Gonadektomie

Ziel des Projektes war es, den gonadektomierten männlichen Wistar-Ratten in der jeweiligen Testo- bzw. DHT-Gruppe Testosteronpropionat oder 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron in normophysiologischen Konzentrationen zu substituieren. Hiermit wollten wir die physiologische Bedeutung der Androgene für das blutdruckregulierende System in der Niere beurteilen. Die Androgenkonzentration der unterschiedlichen Behandlungsgruppen sind in Tab. 6 dargestellt.

In der Bestimmung der Androgenkonzentration bei Abschluss der Versuchsreihe war das Serum-Testosteron bei den Ratten, die mit Testosteronpropionat behandelt wurden, sowohl in der Placebo-behandelten als auch in der mit Flutamid behandelten Gruppe stark über dem durchschnittlichen physiologischen Serumniveau erhöht. Die intakten männlichen Wistar-Ratten zeigten unter natriumarmer Diät durchschnittliche Serumkonzentration von  $1,7 \pm 0,6$  ng/ml und unter natriumreicher Diät von  $3,6 \pm 3,2$  ng/ml.

So zeigten jedoch die mit Testosteron behandelten Tiere in der Placebogruppe durchschnittliche Werte von  $11,8 \pm 3,3$  ng/ml bei Niedrigsalzdiät und  $8,4 \pm 1,1$  ng/ml bei Hochsalzdiät. In der Flutamidgruppe wurden durchschnittliche Werte von  $15,9 \pm 4,8$  ng/ml bei Niedrigsalzdiät und  $12,6 \pm 3,3$  ng/ml bei Hochsalzdiät gemessen. Zudem hatten die mit Testosteron behandelten Ratten der Flutamidreihe bei gleicher

Substitutionsmenge zu den mit Testosteron behandelten Ratten der Placeboreihe tendenziell erhöhte Serumwerte. Dies war jedoch nicht signifikant.

Eine natriumreiche Diät bei den mit Testosteron behandelten Ratten war im Vergleich zur natriumarmen Diät mit niedrigeren Serum-Testosteronkonzentrationen in der Placebogruppe assoziiert ( $p < 0,01$ ). Auch in der Flutamidgruppe war die Tendenz erniedrigter Testosteronwerte bei natriumreichen Bedingungen im Vergleich zu natriumarmen Bedingungen ersichtlich.

Behandlungsgruppe			Serum-Testosteron [ng/ml]	Serum-5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron [ng/ml]
Placebo	Niedrigsalzdiät	Intakt	1,7 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,1
		Kontr	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
		Testo	11,8 $\pm$ 3,3**	0,9 $\pm$ 0,7*
		DHT	0,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,5**
	Hochsalzdiät	Intakt	3,6 $\pm$ 3,2	0,4 $\pm$ 0,1
		Kontr	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
		Testo	8,4 $\pm$ 1,1 <sup>§§</sup>	0,9 $\pm$ 0,3 <sup>§</sup>
		DHT	0,6 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 0,6
Flutamid	Niedrigsalzdiät	Kontr	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
		Testo	15,9 $\pm$ 4,8**	0,8 $\pm$ 0,2**
		DHT	1,1 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,4**
	Hochsalzdiät	Kontr	0,1 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,0
		Testo	12,6 $\pm$ 3,3 <sup>§§</sup>	1,2 $\pm$ 0,7 <sup>§§</sup>
		DHT	0,8 $\pm$ 0,7	0,8 $\pm$ 0,2 <sup>§§</sup>

**Tab. 6: Androgenkonzentration in den jeweiligen Behandlungsgruppen.** Normotensive Wistar-Ratten wurden orchietomiert und einer Niedrigsalzdiät mit NaCl < 0,03 % bzw. einer Hochsalzdiät mit NaCl 4 % ausgesetzt. Zusätzlich zu der Diät wurden alle Ratten mit Oleum sesami (Kontr), Testosteronpropionat (Testo) oder 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) und gleichzeitiger Gabe von Oleum sesami (Placebo) oder Flutamid für 16 d behandelt. Teildaten wurden im Rahmen anderer Studien unserer Forschungsgruppe schon veröffentlicht [85]. n=6. Als Referenz dienten intakte männliche, normotensive Wistar-Ratten (Intakt). n=4. Mittelwerte  $\pm$  SD. \*= $p < 0,05$  im Vergleich zur jeweiligen natriumarm ernährten Kontrollgruppe; \*\*= $p < 0,01$  im Vergleich zur jeweiligen natriumarm ernährten Kontrollgruppe; <sup>§</sup>= $p < 0,05$  im Vergleich zur jeweiligen natriumarm ernährten Kontrollgruppe; <sup>§§</sup>=  $p < 0,01$  im Vergleich zur jeweiligen natriumreich ernährten Kontrollgruppe.

Supraphysiologische Werte wurden ebenso für 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron in den mit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron behandelten Ratten sowohl der Placebo- als auch der Flutamidreihe gemessen. So wurden in der Placebogruppe durchschnittliche Werte von 1,1  $\pm$  0,5 ng/ml bei Niedrigsalzdiät und 0,8  $\pm$  0,6 ng/ml bei Hochsalzdiät ermittelt.

In der Flutamidgruppe zeigten sich durchschnittliche Werte von  $1,3 \pm 0,4$  ng/ml bei Nidrigsalzdiät und  $0,8 \pm 0,2$  ng/ml bei Hochsalzdiät.

Die hohen Standardabweichungen in den mit Androgenen behandelten Tieren zeigen die beobachteten Schwankungen der Messungen bei den einzelnen Tieren auf. Dies galt sowohl für das Serum-Testosteron als auch das Serum-5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron.

### **3.1.2 Blutdruck in Abhängigkeit von Androgen-und Kochsalzbehandlung**

Für die mit Testosteron behandelten Tiere zeigte sich gegenüber den Ratten, welche natriumarm ernährt und keiner Androgenbehandlung ausgesetzt wurden (als „Kontrollgruppe“ bezeichnet), ein Blutdruckanstieg von durchschnittlich  $14,5 \pm 0,8$  mmHg ( $p < 0,01$ ) und für die mit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron behandelten Tiere ein Anstieg von  $9,8 \pm 0,5$  mmHg (Abb. 6,  $p > 0,05$ ). Bemerkenswert ist hierbei, dass bei beiden Androgenen ein Anstieg des Blutdrucks zu verzeichnen ist, jedoch für Testosteron deutlich stärker als für das potentere Androgen 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron.

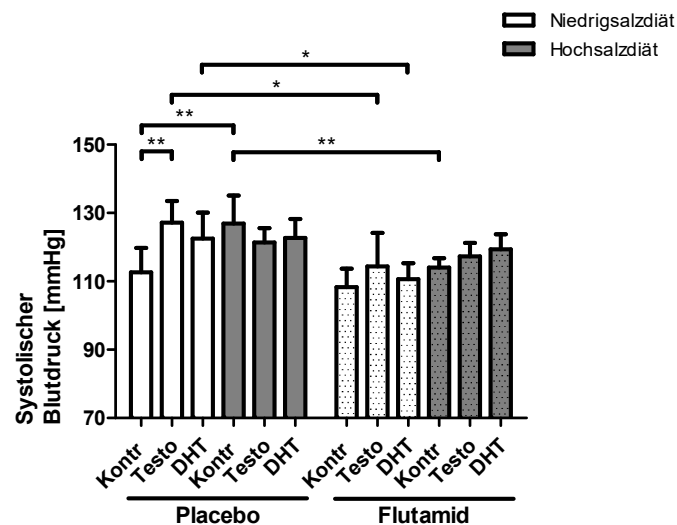
Die männlichen Wistar-Ratten, welche mit Testosteronpropionat oder 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den Tieren, die nicht mit einem Androgen behandelt wurden (hier als „Placebo behandelt“ bezeichnet) unter einer salzarmen Diät einen höheren Blutdruck (Abb. 6).

Eine natriumreiche Diät bei Ratten ohne Androgenbehandlung führte zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks um  $14,2 \pm 1,1$  mmHg im Vergleich zur natriumarmen Diät (Abb. 6,  $p < 0,01$ ). Der beobachtete Anstieg des Blutdrucks bei natriumarm ernährten Ratten durch zusätzliche Androgensubstitution im Vergleich zu der Kontrollgruppe blieb für die mit Androgen behandelten Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei natriumreicher Ernährung aus.

Nach Applikation von Flutamid, einem AR-Antagonisten, entwickelten die Tiere grundsätzlich einen niedrigeren Blutdruck im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren. Signifikant war dies im Falle der natriumarm ernährten Testosteron- bzw. 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron applizierten Tiere aus der Placebogruppe im Vergleich zu den jeweils natriumarm ernährten Testosteron- bzw. 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron applizierten Tieren aus der Flutamidgruppe ( $p < 0,05$ ). Auch unter natriumreichen Bedingungen senkte Flutamid den Blutdruck. Hierbei zeigten sich

in der natriumreich ernährten Kontrollgruppe aus der Placeboreihe deutlich höhere Blutdruckwerte mit einem Blutdruckunterschied von ca.  $12,8 \pm 5,5$  mmHg im Vergleich zu der natriumreich ernährten Kontrollgruppe aus der Flutamidreihe ( $p < 0,01$ ).

Die Behandlung mit Androgenen führte zu keinem signifikanten Anstieg des Blutdrucks unter Flutamid. Wie schon bei der Placebogruppe beobachtete man auch bei der mit Flutamid behandelten Gruppe einen Anstieg des Blutdrucks der natriumreich ernährten Kontrolltiere zu den natriumarm ernährten Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 6: Systolischer Blutdruck in männlichen Wistar-Ratten in Abhängigkeit von Salzstatus und Androgensubstitution.** Normotensive Wistar-Ratten wurden orchiektomiert und einer Niedrigsalzdiät mit NaCl  $< 0,03\%$  (weiße Balken) bzw. einer Hochsalzdiät mit NaCl  $4\%$  (graue Balken) ausgesetzt. Zusätzlich zu der Diät wurden alle Ratten mit Oleum sesami (Kontr), Testosteronpropionat (Testo) oder  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) und gleichzeitiger Gabe von Oleum sesami (Placebo) oder Flutamid für 16 d behandelt. Teildaten wurden im Rahmen anderer Studien unserer Forschungsgruppe schon veröffentlicht [85].  $n=6$ . Mittelwerte  $\pm$  SD. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

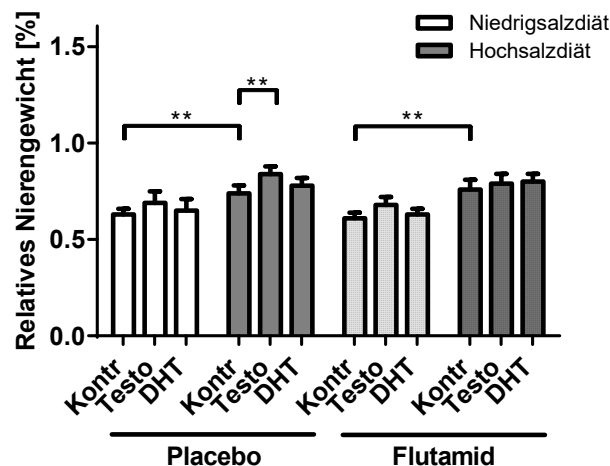
### 3.1.3 Relatives Nierengewicht der Wistar-Ratten

Das relative Nierengewicht wurde aus dem Verhältnis des Gewichts beider Nieren zu dem Gesamtkörpergewicht bestimmt (Abb. 7).

Bei männlichen Wistar-Ratten führte die Androgenbehandlung unabhängig von der Natriumdiät zu einem Anstieg des relativen Nierengewichts, sowohl für Testosteron als auch für DHT. Interessanterweise war der zu beobachtende Anstieg des

Nierengewichts nach Testosteronbehandlung in der Regel höher als unter DHT-Behandlung. In der Placebogruppe stieg das relative Nierengewicht bei natriumarmer Diät um 0,06 % unter Testosteronbehandlung bzw. um 0,02 % unter DHT-Behandlung an. Im Falle einer natriumreichen Diät betrug der Anstieg durch Testosteron 0,10 % ( $p < 0,01$ ) und durch  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron 0,04 %. Unter zusätzlicher Behandlung mit Flutamid kam es zu keinem signifikanten Gewichtsanstieg bei gleichzeitiger Testosteron- und DHT-Behandlung (Abb. 7).

Die natriumreiche Diät führte gegenüber der natriumarmen Diät zu einem deutlichen und statistisch signifikanten Anstieg des Nierengewichts. Dieser betrug in der Placebokontrollgruppe 0,11 % ( $p < 0,01$ ) und in der Flutamidkontrollgruppe 0,15 % ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 7: Relatives Nierengewicht (beide Nieren in g/100g Körpergewicht) angegeben in Prozent vom Gesamtgewicht.** Männliche, orchietomierte Wistar-Ratten unter Niedrigsalzdiät (weiße Balken) bzw. Hochsalzdiät (graue Balken). Behandlung mit Oleum sesami (Kontr bzw. Placebo), Testosteronpropionat (Testo),  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) und Flutamid für 16 d. Teildaten wurden im Rahmen anderer Studien unserer Forschungsgruppe schon veröffentlicht [85].  $n=6$ . Mittelwerte  $\pm$  SD. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

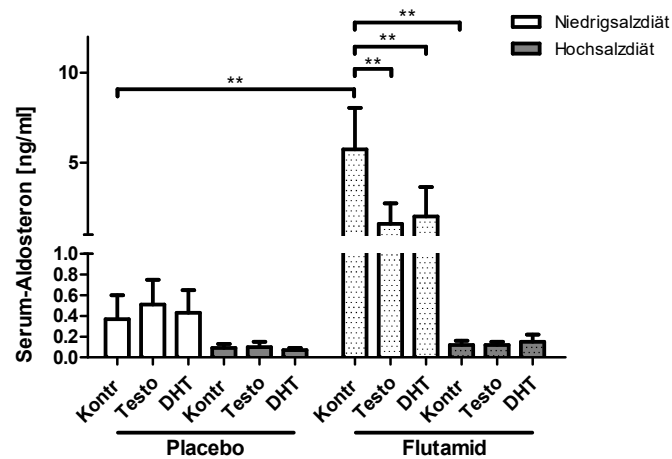
### 3.1.4 Serum-Aldosteronkonzentration der Wistar-Ratten

Zur besseren Beurteilung einer möglichen Interaktion zwischen Androgenen und dem mineralokortikoiden System wurde die Aldosteronkonzentration im Serum der Wistar-Ratten gemessen (Abb. 8).



So wurden in allen natriumreich ernährten männlichen orchiektomierten Wistar-Ratten niedrigere Serum-Aldosteronwerte als in den natriumarm ernährten Tieren detektiert. In der Placebogruppe zeigte eine zusätzliche Androgenbehandlung sowohl unter natriumarmen als auch unter natriumreichen Bedingungen keine Veränderung der Serum-Aldosteronkonzentration.

Interessanterweise war jedoch unter der Behandlung mit Flutamid, also der Blockade des AR, in den natriumarm ernährten, nicht mit Androgenen behandelten Ratten ein deutlicher Aldosteronanstieg um mehr als 5 ng/ml zu vermerken. Bei gleichzeitiger Gabe von Testosteron bzw. DHT war dieser Effekt abgeschwächt.



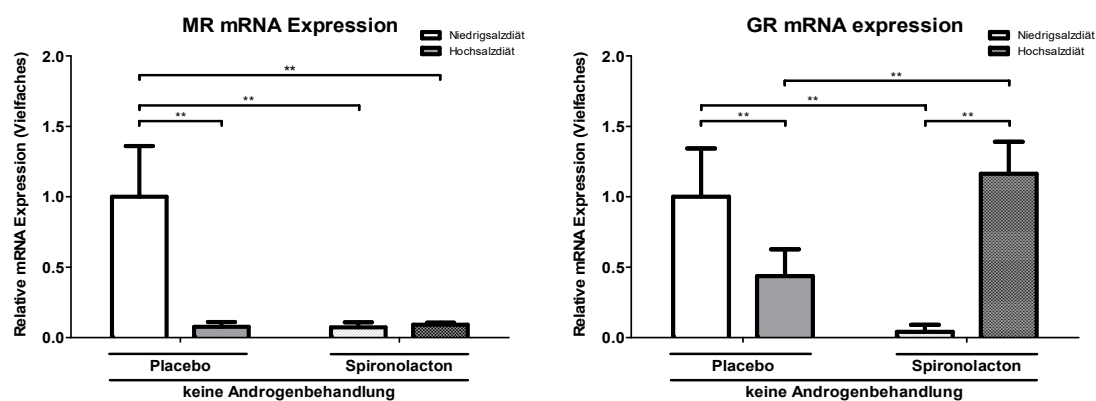
**Abb. 8: Serum-Aldosteronkonzentration in den jeweiligen Behandlungsgruppen.** Normotensive Wistar-Ratten wurden orchiektomiert und einer Niedrigsalzdiät mit NaCl <0,03% bzw. einer Hochsalzdiät mit NaCl 4% ausgesetzt. Zusätzlich zu der Diät wurden alle Ratten mit Oleum sesami (Kontr), Testosteronpropionat (Testo) oder 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) und gleichzeitiger Gabe von Oleum sesami (Placebo) oder Flutamid für 16 d behandelt. Teildaten wurden im Rahmen anderer Studien unserer Forschungsgruppe schon veröffentlicht [85]. n=6. Mittelwerte  $\pm$  SD. \*\*= p<0,01.

### 3.2 Expression von renalem MR und GR unter unterschiedlicher Salzbelastung

Mit der Messung der mRNA Expression des MR und des GR unter unterschiedlicher Natriumbelastung sollten die Effekte einer erhöhten Salzzufuhr auf die Regulation des MR und des GR untersucht werden. Dabei dienten die salzarm behandelten Tiere

ohne weitere Behandlung als Referenz zu den Ratten, die eine salzreiche Diät erhielten.

Deutlich wurde, dass die männlichen Wistar-Ratten, welche keine Androgenbehandlung erhielten, unter einer natriumreichen Diät im Gegensatz zu einer natriumarmen Diät eine um mehr als 90 % verminderte MR-Expression aufwiesen. Dieser Rückgang war hochsignifikant (Abb. 9,  $p < 0,01$ ). Unter MR-Blockade durch den Wirkstoff Spironolacton wurde eine gleichgerichtete Regulation wie beim salzvermittelten Rückgang der MR mRNA beobachtet. Hierbei war die Suppression der MR mRNA unabhängig vom Salzstatus.



**Abb. 9: Expression des renalen MR und GR in Abhängigkeit einer unterschiedlichen Salzaufnahme und einer Behandlung mit dem Mineralokortikoidantagonisten Spironolacton.** Männliche, orchietomierte Wistar-Ratten unter Niedrigsalzdiät (weiße/helle Balken) bzw. Hochsalzdiät (dunkelgraue Balken). Behandlung mit Oleum sesami (Placebo) und Spironolacton für 16 d. Darstellung des Vielfachen der mRNA Expression gegenüber der mit Placebo behandelten, natriumarm ernährten Kontrollgruppe, welche 1 gesetzt wurde.  $n=6$ . Mittelwerte  $\pm$  SD. \*\*:  $p < 0,01$ .

Für die GR-Expression wurden ähnliche Beobachtungen in der Placeboreihe gemacht. Auch hier zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der GR mRNA bei vermehrter Salzzufuhr (Abb. 9). Zusätzlich wurde unter salzarmer Ernährung und Spironolacton die GR mRNA Expression deutlich supprimiert. Überraschenderweise konnten wir hier unter der Behandlung mit Spironolacton und vermehrter Salzzufuhr eine Hochregulation von GR mRNA im Vergleich zu geringer Salzzufuhr beobachten: Ein hochsignifikanter Anstieg um mehr als das 30-fache unter der Spironolactongabe in den natriumreich ernährten Tieren im Vergleich zu den natriumarm ernährten Tieren war erkennbar ( $p < 0,01$ ).

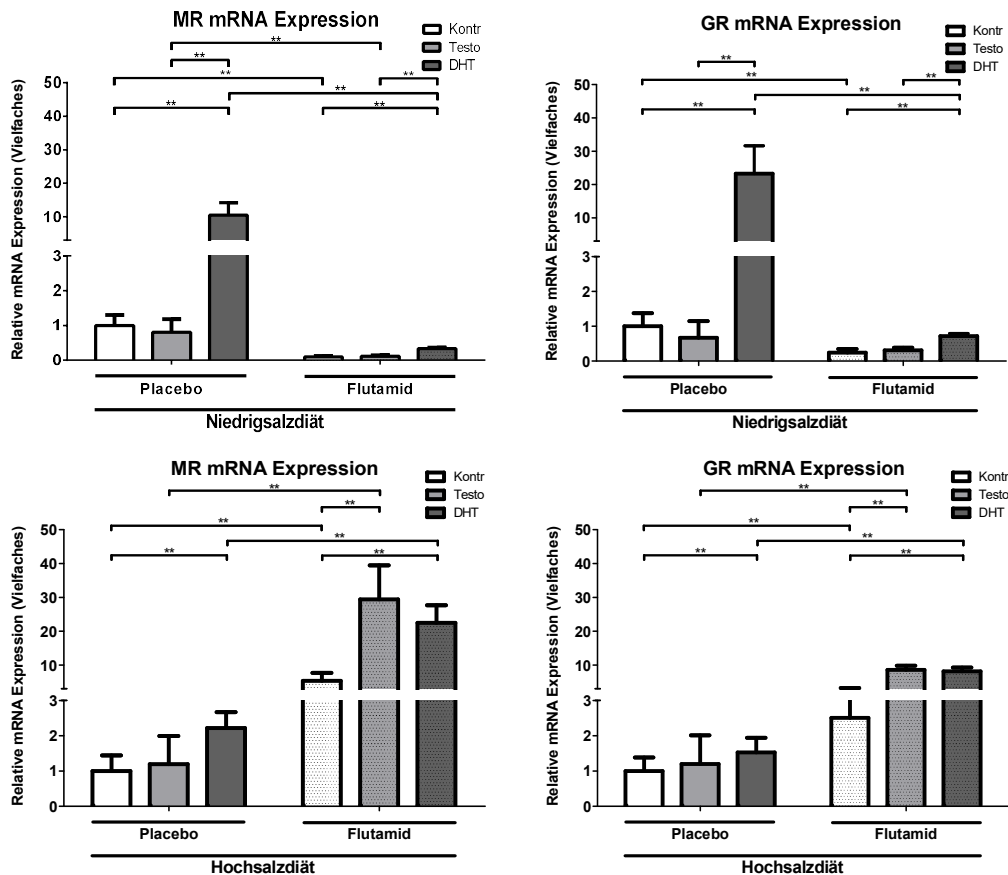
### 3.3 Einfluss der Androgene auf die renale MR- und GR-Expression

Diese Analysen sollten zeigen, ob eine Androgensubstitution die renale Expression der an dem Blutdruck beteiligten und gleichzeitig in starker Homologie zum AR stehenden Gene in unterschiedlichen Behandlungsmodellen modifiziert (Abb. 10).

Die Stimulation mit Androgenen, insbesondere mit DHT, bewirkte unabhängig von der Salzzufuhr bzw. der zusätzlichen Blockade des Androgenrezeptors durch den Wirkstoff Flutamid einen Anstieg der Genexpression sowohl des MR also auch des GR. Vor allem unter DHT-Behandlung zeigte sich in den natriumarm ernährten Ratten der Placeboreihe eine über 10fache Hochregulation des MR und eine über die 20fache Hochregulation des GR. Beide Änderungen waren hochsignifikant (Abb. 10,  $p < 0,01$ ). Die Stimulation der Tiere mit Testosteron zeigte weder in den natriumarm behandelten Tieren noch in den natriumreich behandelten Tieren eine signifikante Veränderung der Expression des MR und des GR.

Interessanterweise bewirkten aber unter Blockade des AR mit Flutamid sowohl die zusätzliche Gabe von Testosteron als auch von DHT unter einer Hochsalzdiät deutliche Anstiege der Genexpression des MR und des GR im Vergleich zu der jeweiligen Androgen-unbehandelten Kontrollgruppe (Kontr). Während also unter natriumarmen Bedingungen die zusätzliche Flutamidgabe die Effekte der Androgene auf die MR und GR mRNA Expression unterdrückt wurden, wurden diese Effekte unter natriumreicher Ernährung potenziert.

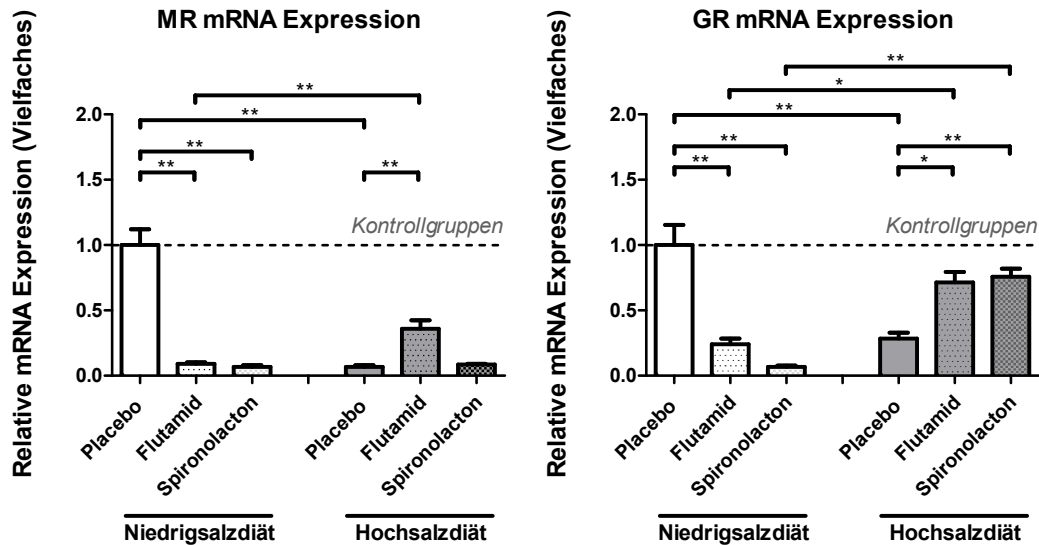
Flutamid selbst führte zu einer signifikanten Erhöhung von MR und GR mRNA unter salzreichen Bedingungen und hat andere Wirkung als bei salzarmen Bedingungen, wo sich eine signifikante Herunterregulation der MR und GR Expression zeigte.



**Abb. 10: Expression des renalen MR und des renalen GR in Abhängigkeit einer Androgensubstitution und Behandlung mit Flutamid.** Männliche, orchiectomierte Wistar-Ratten unter Niedrigsalzdiät bzw. Hochsalzdiät. Behandlung mit Oleum sesami (Kontr: weiße Balken; Placebo), Testosteronpropionat (Testo: hellgraue Balken), 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT: dunkelgraue Balken) oder Flutamid für 16 d. Darstellung des Vielfachen der mRNA Expression gegenüber der unstimulierten Placebo-behandelten Kontrollgruppe. Mittelwerte  $\pm$  SD. \*: p<0,05; \*\*: p<0,01.

### 3.4 Expression von renalem MR und GR unter AR- und MR-Blockade

Mit der Behandlung von Flutamid, einem AR-Antagonisten, und Spironolacton, einem MR-Antagonisten, wollten wir sehen, ob die Effekte von Salz und Androgenen aufhebbar sind. Gleichzeitig war jedoch auch von Interesse, wie sich die beiden Wirkstoffe auf die MR und GR mRNA Expression in der Niere im Vergleich zur Placebo behandelten Kontrollgruppe auswirken (Abb. 11).



**Abb. 11: Renale MR und GR mRNA Expression in Kontrollgruppen im Vergleich zur Flutamidgabe und Spironolactongabe.** Männliche, orchiektomierte Wistar-Ratten unter Niedrigsalzdiät bzw. Hochsalzdiät. Behandlung mit Oleum sesami (Placebo), Flutamid oder Spironolacton für 16 d. Darstellung des Vielfachen der mRNA Expression gegenüber der unstimulierten mit Placebo behandelten Kontrollgruppe. Mittelwerte  $\pm$  SD. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Unter einer erhöhten Salzzufuhr wurde die MR mRNA Expression signifikant herunterreguliert. Dies galt auch für die GR mRNA Expression ( $p < 0,01$ ).

Die Blockade des MR durch Spironolacton bewirkte eine Herunterregulation von MR und GR mRNA in den Kontrolltieren unter einer Niedrigsalzdiät. Interessanterweise zeigten die Ratten unter einer Hochsalzdiät und zusätzlicher Gabe von Spironolacton eine Heraufregulation der GR mRNA Expression im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, während die MR mRNA Expression supprimiert blieb.

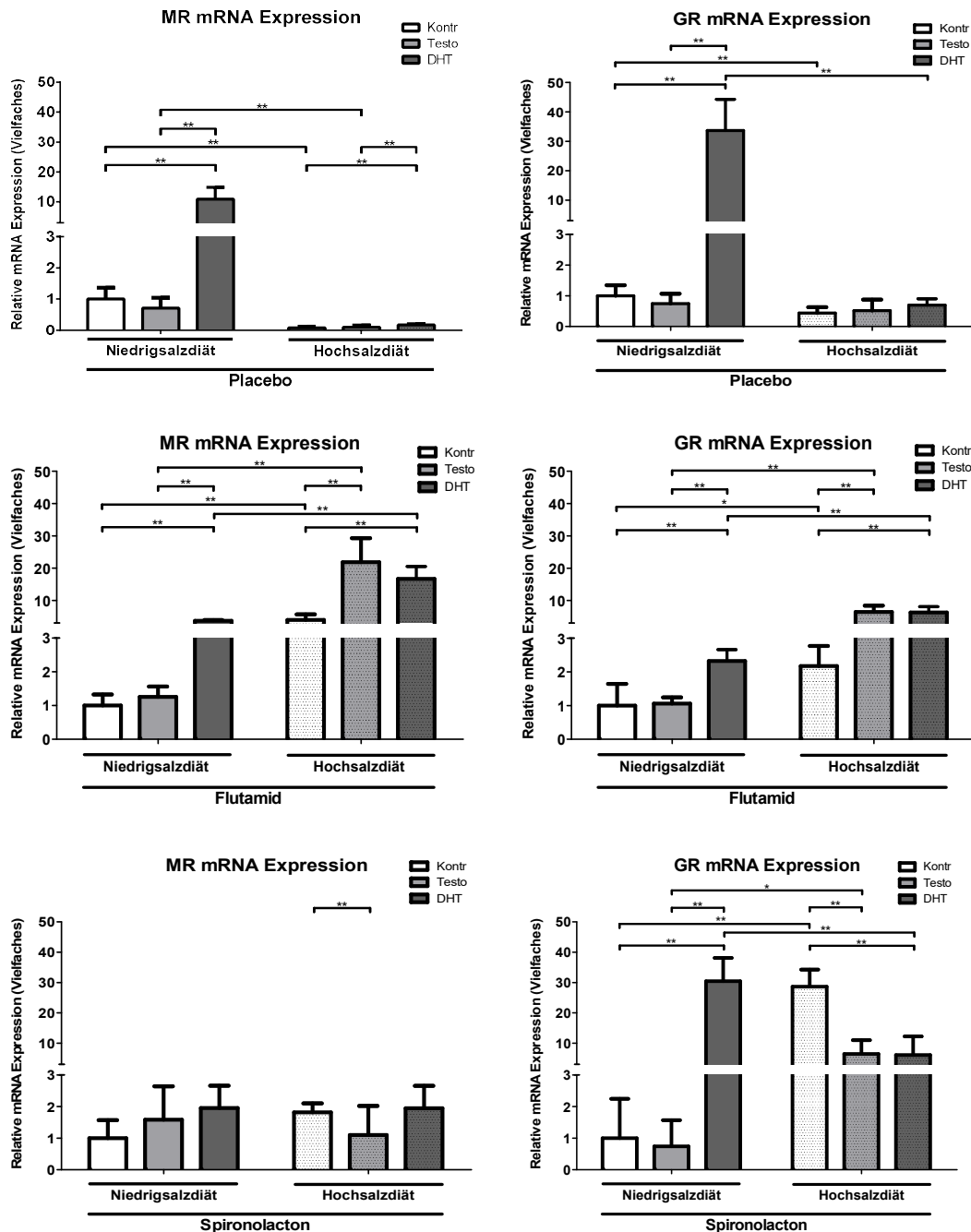
Über die Wirkung von Flutamid auf die MR und GR mRNA Expression in der Niere ist wenig bekannt. Wir sahen, dass Flutamid sowohl in den natriumarm ernährten als auch in den natriumreich ernährten, gonadektomierten Tieren auf die Expression von MR und GR einwirkt. Dabei stellten wir fest, dass unter natriumarmer Diät Flutamid die MR und GR mRNA Expression im Vergleich zur unbehandelten Placebogruppe herunterreguliert. Unter natriumreicher Diät wurden die MR und GR Expression im Vergleich zur unbehandelten Placebogruppe hochreguliert.

### **3.5 Wechselwirkungen von Salzzufuhr und Androgensubstitution auf die renale MR- und GR-Expression**

Hier sollte der Einfluss von Androgenen auf die MR- und GR-Expression unter unterschiedlicher Salzaufnahme untersucht werden (Abb. 12).

Es war zu sehen, dass in der Placebo-Versuchsreihe eine erhöhte Salzzufuhr zu einer deutlichen Suppression der MR mRNA Expression führte ( $p < 0,01$ ), die zusätzliche Gabe von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron führte zu einer signifikanten Heraufregulation ( $p < 0,01$ ). Diese blieb jedoch unterhalb der MR-Expression der Placebo-behandelten, natriumarm ernährten Kontrollgruppe. Interessanterweise führte bei den natriumarm ernährten Tieren die Zugabe von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron zu einem 12-fachen Anstieg der MR mRNA Expression ( $p < 0,01$ ). Diese Beobachtungen trafen parallel auch für die GR mRNA Expression zu, wobei hier die Heraufregulation durch DHT in den natriumreich ernährten Tieren nicht signifikant war. Eine Testosteronbehandlung führte zu keiner signifikanten Expressionsänderung von MR und GR bei unterschiedlichem Salzstatus in der Placeboreihe.

Unter AR-Blockade durch Flutamid zeigte sich unter Hochsalzdiät eine eindeutige Heraufregulation sowohl der MR als auch der GR mRNA Expression ( $p < 0,01$  für MR,  $p < 0,05$  für GR). Zusätzlich zeigte sich bei gleichzeitiger Applikation von Androgenen in den natriumreich ernährten Tieren unter Flutamid ein zusätzlicher, signifikanter Anstieg der Expression von jeweils MR und GR mRNA ( $p < 0,01$ ). Hierbei stieg durch zusätzliche Androgenapplikation die MR mRNA Expression um ca. das 4-fache und die GR mRNA Expression um ca. das 2,5-fache an. Für DHT war dieser Effekt auch in den natriumarm ernährten Tieren der Flutamidreihe zu beobachten, nicht jedoch für Testosteron. Unter Einfluss einer MR-Blockade durch Spironolacton wurde keine wesentliche Regulation der MR mRNA durch erhöhte Salzzufuhr oder Androgene festgestellt. Die Ausnahme bildete hier das Testosteron in den natriumreich ernährten Tieren: Hier zeigte sich eine Herunterregulation im Vergleich zu der natriumreich ernährten Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Die GR mRNA Expression wurde in den natriumreich ernährten Tieren im Vergleich zu den natriumarm ernährten Tieren unter MR-Blockade jedoch signifikant hochreguliert ( $p < 0,01$ ). Hier bewirkte die zusätzliche Gabe von Androgenen bei den natriumreich ernährten Tieren eine signifikante Herunterregulation der GR mRNA Expression ( $p < 0,01$ ).



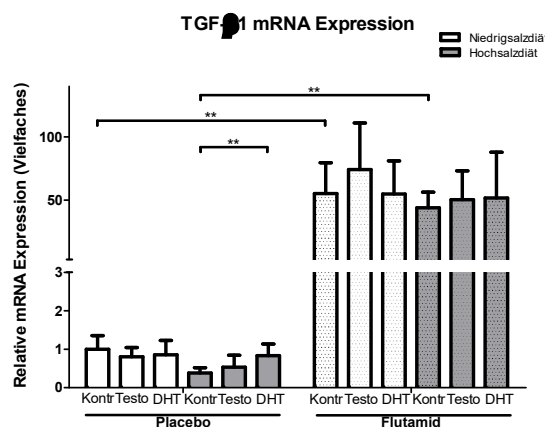
**Abb. 12: Expression des renalen MR und des renalen GR in Abhängigkeit von Salzzufuhr und Androgensubstitution unter Zugabe von Flutamid oder Spironolacton.** Männliche, orchietomierte Wistar-Ratten unter Niedrigsalzdiät bzw. Hochsalzdiät. Behandlung mit Oleum sesami (Kontr: weiße Balken; Placebo), Testosteronpropionat (Testo: hellgraue Balken), 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT: dunkelgraue Balken), Flutamid oder Spironolacton für 16 d. Darstellung des Vielfachen der mRNA Expression gegenüber der unstimulierten mit Placebo behandelten Kontrollgruppe. Mittelwerte  $\pm$  SD. \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

### 3.6 Expression von renalem TGF- $\beta$ 1 in Abhängigkeit von Salzzufuhr und Androgensubstitution

Das Zytokin TGF- $\beta$ 1 ist bekannt als eines der Zielproteine des MR. Es reguliert vor allem Fibrose- und Umbauprozesse in der Niere (Abb. 13).

Die Salzzufuhr selbst hatte keinen signifikanten Einfluss auf die relative Genexpression des TGF- $\beta$ 1. Marginal geringere TGF- $\beta$ 1 mRNA Expressionswerte waren in den natriumreich gegenüber den natriumarm ernährten Tieren ersichtlich.

Testosteron- und DHT-Behandlung zeigten im Vergleich zu den Androgen-unbehandelten Tieren des natriumreich ernährten Arms sowohl in der Placebo- als auch in der Flutamidgruppe eine leicht erhöhte Expression der TGF- $\beta$ 1 mRNA. Dies war jedoch lediglich in der Placeboreihe für die natriumreich ernährte, mit DHT behandelte Gruppe im Vergleich zur natriumreich ernährten Kontrollgruppe signifikant ( $p < 0,01$ ). Interessanterweise wurde durch die zusätzliche Behandlung mit Flutamid die TGF- $\beta$ 1 mRNA Expression signifikant auf das 50–60-fache gesteigert, sowohl in den salzarm als auch in den salzreich ernährten Gruppen ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 13: Genexpression des renalen TGF- $\beta$ 1 in Abhängigkeit von Salzzufuhr und Androgensubstitution.** Männliche, orchiektomierte Wistar-Ratten unter Niedrigsalzdiät (weiße Balken) bzw. Hochsalzdiät (graue Balken). Behandlung mit Oleum sesami (Kontr, Placebo) und Testosteronpropionat (Testo), 5 $\alpha$ - Dihydrotestosteron (DHT) oder Flutamid für 16 d. Darstellung des Vielfachen der mRNA Expression gegenüber der unstimulierten mit Placebo behandelten, natriumarm ernährten Kontrollgruppe. Beispielhaft sind die Signifikanzen von der jeweiligen Kontrollgruppe der Placeboreihe zur Kontrollgruppe der Flutamidgruppe eingezeichnet. Alle Gruppen aus der Placeboreihe waren zu jeweils allen Gruppen der Flutamidreihe signifikant. Mittelwerte  $\pm$  SD. \*\*:  $p < 0,01$ .



### **3.7 Proteinexpression des MR und GR unter unterschiedlichen Behandlung**

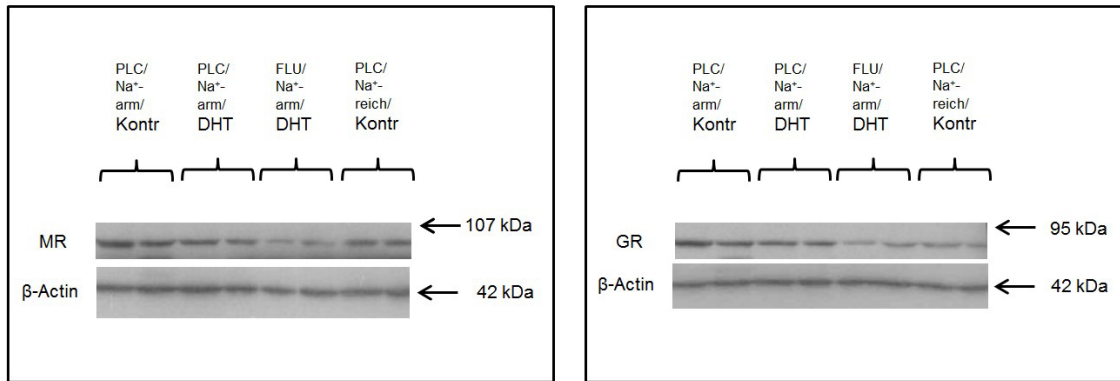
Des Weiteren wollten wir die Regulation des renalen MR und GR auf Proteinebene unter Einfluss von Salz und Androgenen beurteilen (Abb. 14).

Hier konnte man sehen, dass die zusätzliche Salzbelastung der unstimulierten salzarm ernährten männlichen Wistar-Ratten zu einer Herunterregulation sowohl der MR-Proteinexpression als auch der GR-Proteinexpression in der Niere führte. Diese Ergebnisse korrelieren auch mit den Ergebnissen auf mRNA Ebene, so war hierbei die Transkriptionsrate der MR und GR mRNA durch zusätzliche Hochsalzdiät herunterreguliert (Abb. 9).

Interessant ist, dass wir den deutlichen Anstieg auf das über 10fache der MR und auf das über 20fache der GR mRNA Expression durch zusätzliche DHT-Behandlung in den natriumarm behandelten Ratten auf Proteinebene nicht sehen (Abb. 10).

Jedoch war unter der Blockade des AR durch Flutamid und gleichzeitiger Gabe von dem potenteren Androgen DHT im Vergleich zur DHT-behandelten, natriumarm ernährten Placebogruppe eine Herunterregulation des MR und GR sowohl der mRNA als auch der Proteinexpression zu vermerken (Abb. 10). So konnte der Androgeneffekt durch Flutamid aufgehoben werden.

Die Proteinexpression von MR und GR wurde durch Flutamid sogar im Vergleich zu den nicht mit Androgen behandelten, gonadektomierten Kontrolltieren bei salzarmer Diät (PLC/ Na<sup>+</sup>-arm/ Kontr) herunterreguliert (Abb. 14). Auf mRNA Ebene war hierbei die MR- und GR-Expression durch gleichzeitige Gabe von Flutamid und DHT im Vergleich zu den nicht mit Androgenen behandelten, gonadektomierten Kontrolltieren bei Nidrigsalzdiät herunterreguliert (Abb. 10).



**Abb. 14: Repräsentative Darstellung der Proteinexpression von MR und GR in der Niere mittels Western Blot.** Dargestellt ist die unstimulierte Placebo-behandelte, natriumarm ernährte Kontrollgruppe (PLC/ Na<sup>+</sup>-arm/ Kontr), die Placebo-behandelte sowie die Flutamid-behandelte, natriumarm ernährte DHT-Gruppe (PLC/ Na<sup>+</sup>-arm/ DHT bzw. FLU/ Na<sup>+</sup>-arm/ DHT) und die Placebo-behandelte, natriumreich ernährte Kontrollgruppe (PLC/ Na<sup>+</sup>-reich/ Kontr). Als Referenzprotein wurde  $\beta$ -Actin gewählt.

## 4 Diskussion

Das hiesige Studiendesign sollte die physiologische Wirkung der Androgene in Abhängigkeit des Salzstatus in männlichen Wistar-Rattennieren untersuchen, wozu die Wistar-Ratten jeweils einer natriumarmen (<0,3 % NaCl) bzw. einer natriumreichen (4 % NaCl) Diät ausgesetzt wurden. Nach einer kurzen anfänglichen Adaptionsphase an die Diät wurden die Tiere randomisiert, um zusätzlich mit Placebo, Testosteron oder DHT behandelt zu werden. Hierbei diente die Placebogruppe als Referenz zu den Androgen-substituierten Gruppen, um die Androgenwirkung auf die Niere zu beurteilen. Parallel wurden Tiere zusätzlich mit Flutamid bzw. Spironolacton behandelt. Hierbei sollte nachgewiesen werden, dass die Wirkungen der Androgene bzw. des Salzes über den AR bzw. MR vermittelt werden und deren Wirkung durch die jeweilige Blockade aufgehoben werden kann.

### 4.1 Validierung des *in vivo* Modells und Charakterisierung des Studiendesigns

Aufgrund der pleiotropen Eigenschaften der Androgene in den unterschiedlichen Geweben wurden die kastrierten Wistar-Ratten entweder mit Testosteron oder DHT in, mit anderen Studien vergleichbarer, physiologischer Konzentration substituiert. So beschrieben GHANADIAN ET AL. physiologische Konzentration von  $2,5 \pm 0,27$  ng/ml für Testosteron,  $0,19 \pm 0,02$  ng/ml für DHT und ein Testosteron/DHT-Ratio von 13:1 bei männlichen adulten Wistar-Ratten [91]. Wir sahen in den intakten männlichen Wistar-Ratten unabhängig vom Salzstatus eine Testosteronkonzentration von durchschnittlich 2,7 ng/ml und einen DHT-Konzentration von 0,4 ng/ml. Dies bestätigte somit vergleichbare Werte aus der Literatur und physiologische S wurden wie gewünscht erreicht.

In den mit Androgenen behandelten kastrierten Tieren bestimmten wir jedoch stark schwankende Serumkonzentrationen, die im supraphysiologischen Bereich lagen. Allerdings konnte für die Testosteron-applizierten Ratten eine ähnliche Testosteron/DHT-Ratio von 13:1 gemessen werden. Die Blutentnahmen erfolgten kurz

nach Injektion des Tieres mit dem jeweiligen Androgen am Tag der Tötung des Tieres, sodass durch die vorhergehende Injektion supraphysiologische Spitzenkonzentrationen erklärt sein können. Da die Applikation von Testosteron und DHT der gängigen Menge entsprach, gehen wir in dem von uns angewandten Modell von einem physiologischen Wirkungsbereich der Androgene auf den Metabolismus aus [91, 92]. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass Tagesprofil, Alter und Stress zu Schwankungen der Androgenwerte führen können und je nach Detektionsmethode in der Literatur variieren [91-95]. So ermittelten zum Beispiel HARRIS UND BARTKE Werte von  $1,7 \pm 0,2$  ng/ml für Testosteron in männlichen adulten Ratten, um in einem anderen Artikel von BARTKE Werte von  $7,30 \pm 2,42$  ng/ml für Testosteron in männlichen adulten Ratten vorzuschlagen [94, 95]. Aufgrund der in unserem Modell orchiektomierten und genormten Ratten lassen sich Schwankungen in den Androgenwerten jedoch am ehesten auf die vorausgehende Injektion erklären.

Durch eine natriumreiche Diät konnte eine Blutdruckerhöhung induziert werden. Dabei wurde in der salzarmen Gruppe durchschnittlich ein Wert von 113 mmHg und in der salzreichen von 127 mmHg gemessen. So wurden die blutdrucksteigernden Effekte des Salzes in der hiesigen Versuchsreihe bestätigt. Doch auch eine androgen-abhängige Blutdruckerhöhung konnte in den natrium-depletierten Tieren aufgezeigt werden. So führte die Gabe von Testosteron zu einem signifikanten Anstieg des Blutdrucks um durchschnittlich 14,5 mmHg. Auch verschiedene andere Rattenmodelle zeigten, dass Kastration mit erniedrigten Blutdruckwerten und Testosteronapplikation sowohl in männlichen als auch in weiblichen Ratten mit erhöhten Blutdruckwerten einhergingen [47-51]. Dies validierte unser Tiermodell. Zusätzlich zeigte die Blockade des AR durch Flutamid in den natriumarm ernährten Tieren einen deutlichen Rückgang der Blutdruckwerte sowohl für die Testosteron- als auch die DHT-behandelte Gruppe. Dies legt eine durch den AR vermittelte Blutdrucksteigerung nahe. Auch RECKELHOFF ET AL. zeigten, dass in intakten männlichen spontan hypertensiven Ratten (SHR) die AR-Blockade durch Flutamid zu niedrigeren Blutdruckwerten führte. Diese lagen dann in demselben Bereich wie der von kastrierten und intakten weiblichen SHR [96, 97].

In den natriumreich ernährten Wistar-Ratten wurde jedoch kein additiver Effekt der Androgene auf die Erhöhung des Blutdrucks zur Salzbelastung nachgewiesen. Es wäre möglich, dass durch die schon erhöhten Blutdruckwerte aufgrund der

Salzbelastung eventuell ein längerer Behandlungszeitraum mit Androgenen notwendig gewesen wäre.

Um die Nierenbeteiligung an den beobachteten natrium- bzw. androgen-bedingten Blutdruckveränderungen zu verifizieren, nutzten wir in unseren Experimenten das relative Nierengewicht als indirekten Indikator. Hierzu setzten wir das Nierengewicht in Relation zum Gesamtgewicht. So induzierte eine erhöhte Salzlast die Zunahme des Nierengewichts im Verhältnis zum Körpergewicht.

In den natriumreich ernährten Ratten sahen wir bei zusätzlicher Testosteronzugabe einen signifikanten Anstieg des Nierengewichts. PFEIFFER ET AL. registrierten histologisch hypertrophe Eigenschaften von Testosteronpropionat an männlichen und weiblichen Rattennieren und führten diese auf die vermehrte Glomeruli-Anzahl und deren Verdickung zurück [98]. So wäre es denkbar, dass Testosteron bei gleichzeitiger Hochsalzernährung chronische Nierenschädigungen begünstigt und somit auch indirekt die Hypertonieentstehung und die damit einhergehenden kardiovaskulären Risiken beeinflusst [48, 99]. Für DHT konnte lediglich eine Tendenz in Richtung einer Nierengewichtszunahme beobachtet werden. Die Zunahme war nicht signifikant und wurde bisher nicht in der Literatur untersucht. In Fischversuchen mit dreistacheligen Stichlingen konnte jedoch eine Nierenhypertrophie durch DHT hervorgerufen werden [100]. Daher kann hier ein Einfluss der Androgene auf die Nierenhypertrophie vermutet werden.

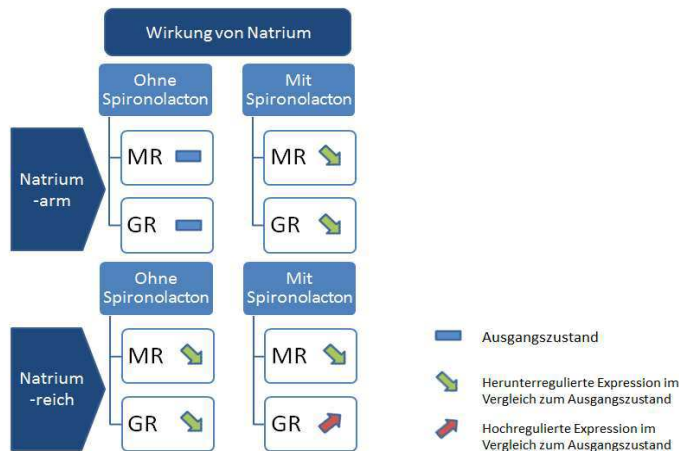
Aldosteron ist Teil des RAAS und regelt über den Natrium- und Wassermetabolismus den Blutdruck. Es ist daher ein weiterer Parameter, um physiologische Zusammenhänge zwischen Salz- und Androgenwirkung auf das RAAS der Niere zu validieren. Die RAAS-Aktivität bzw. die Aldosteronsynthese werden durch negatives Feedback kontrolliert [101], das heißt ein erhöhter Blutdruck oder eine erhöhte Natriumkonzentration führen zur Suppression der Aldosteronproduktion. In unseren Experimenten sahen wir wie erwartet erniedrigte Serum-Aldosteronwerte in den salzreich ernährten Wistar-Ratten im Vergleich zu den salzarm ernährten Ratten. Dies war jedoch nicht signifikant und kann an der geringen Tieranzahl in den jeweiligen Gruppen liegen. Überraschenderweise konnte unter AR-Blockade durch Flutamid ein ausgeprägter Aldosteronanstieg unter natriumarmer Ernährung nachgewiesen werden. Unter natriumreicher Diät war dieser Effekt nicht zu beobachten.

Die Aldosteronwerte korrelierten hierbei nicht mit dem Blutdruck oder dem relativen Nierengewicht in den natriumarm ernährten Tieren, die gleichzeitig mit Flutamid behandelt wurden.

## **4.2 Salzabhängige Regulation des renalen MR und GR**

Die übermäßige Aufnahme von NaCl gilt als Risikofaktor für die Entstehung von Bluthochdruck und die damit einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen. Sie hat insbesondere klinische Relevanz im erhöhten Alter. Dies konnte durch unterschiedliche epidemiologische und klinische Studien an Mensch und Tier nachgewiesen werden [30, 31]. Dabei sind die distalen Nephronabschnitte Hauptwirkungsort zur Feinadjustierung der Salzreabsorption und damit verbundenen Blutdruckregulation. Hier führt Aldosteron gebunden an den MR zur Natrium- und Wasserretention. ACKERMAN ET AL. fanden zudem heraus, dass in den aldosteron-abhängigen Zielzellen der Niere sowohl der MR als auch der GR lokalisiert sind [66]. Beiden Steroidrezeptoren scheint bei der renalen Blutdruckregulation unter pathophysiologischen Zuständen eine wichtige Rolle zu zukommen [44, 46, 102]. So wird unter Mineralokortikoid- und Glukokortikoidexzess wie beim Cushing-Syndrom mittels teils unterschiedlicher Signalwege eine Hypertonie hervorgerufen [70, 103-105]. Unter anderem fanden BAILEY ET AL. anhand eines Mausmodells mit Cushing-Syndrom heraus, dass unter ACTH-Überschuss sowohl der MR als auch der GR die Aktivität des ENaCs erhöhte und eine Zunahme des Blutdrucks verursachte [70].

Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität des RAAS und somit auch des MR durch die Natriumkonzentration und den systemischen Blutdruck modifiziert. Die Rolle des GR unter physiologischen Aspekten ist in der Niere noch nicht gänzlich geklärt. Mit unseren Experimenten wollten wir die salzabhängige Regulation des renalen MR und GR zusammenhängend beurteilen (Abb. 15).

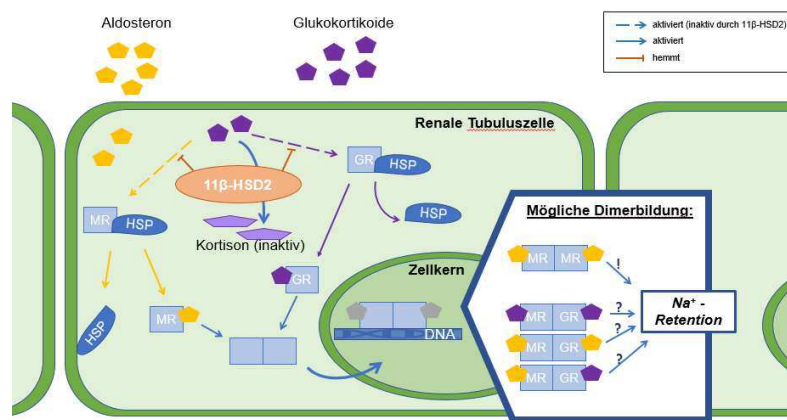


**Abb. 15: Wirkung von Natrium auf die Expression von MR und GR.** Unter natriumreicher Behandlung wird das RAAS supprimiert. MR und GR werden herunterreguliert. Auch unter der MR-Blockade ist der MR supprimiert, während bei natriumreichen Bedingungen die GR-Expression unter Spironolacton erhöht wird.

Bei unseren Versuchen wurden der MR und GR unter salzreicher Diät im Vergleich zu den salzarm ernährten Ratten in ähnlich starkem Maße herunterreguliert. Hierbei war die Genexpression des MR um 94 % und die des GR um 72 % reduziert. Dies lässt sich einbetten in die Erkenntnisse, dass die RAAS- und die damit verbundene ENaC-Aktivität durch negative Rückkopplung reguliert werden und somit unter vermehrter Salzlast die Aktivität herunterreguliert wird [101]. Auch die Proteinexpression beider Rezeptoren zeigte sich unter erhöhter Natriumlast rückläufig.

Sowohl Aldosteron als auch Glukokortikoide binden an beide Rezeptoren. In den Aldosteron-Zielzellen wird der MR durch die NAD<sup>+</sup>-abhängige 11 $\beta$ -HSD2 geschützt indem 11 $\beta$ -HSD2 Kortisol bzw. Kortikosteron zu Kortison bzw. 11-Dehydrokortikosteron konvertiert (Abb. 16). Kortison bzw. 11-Dehydrokortikosteron sind biologisch inaktiv, sodass die Bindung von Glukokortikoiden zum MR und GR in diesen Zellen verhindert wird [66, 71, 82]. So ist die Relevanz der Expression des GR, welcher ebenso in den Aldosteron-sensitiven distalen Nephronabschnitten exprimiert wird, unklar. GAEGGELER ET AL. postulieren, dass die GR-Beteiligung am Salztransport in der Niere bei Salzrestriktion durch die Peaks der Aldosteronausschüttung zunimmt. Geht man davon aus, dass die Glukokortikoide durch das Enzym 11 $\beta$ -HSD2 in inaktivem Zustand metabolisiert worden sind, könnte GR vermehrt Aldosteron binden und somit induziert worden sein. Zusätzlich wurde bei Stress, wenn die Kortikosteronmenge die Kapazität der 11 $\beta$ -HSD2 übersteigt, auch eine vermehrte GR-Beteiligung am Salztransport registriert. Hierbei scheint Kortikosteron dem MR und GR gleichermaßen in den Nierenzellen zur Verfügung zu stehen [71].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine starke synergistische Regulation der MR- und GR-Expression sowohl auf mRNA- also auch auf Proteinebene durch Natrium. Dies impliziert, dass beide Rezeptoren Einfluss auf den Salzhaushalt nehmen und in dessen physiologische Regulation involviert sind. Auch andere Arbeiten untersuchten die gleichgerichtete Regulation des MR und GR [66, 106, 107]. So stellten ACKERMAN ET AL. fest, dass nach Adrenalectomie männlicher Ratten weder MR noch GR in den renalen Epithelialzellen nachweisbar waren. Interessanterweise konnte nach Substitution von Aldosteron in den Zellkernen der renalen Epithelialzellen sowohl der MR als auch der GR induziert werden. Die Zugabe von Kortikosteron induzierte in geringen Mengen nur den MR im aldosteron-sensitiven distalen Nephronabschnitt und erst in höheren Dosen auch den GR [66].



**Abb. 16: Modell der kortikoiden Signaltransduktion.**

Heterodimerbildung von MR und GR zur Aktivierung von Zielgenen, welche die Hypertonieentstehung beeinflussen könnten. HSP: Hitzeschockprotein.

Modifiziert nach MUÑOZ-DURANGO N ET AL., 2015

Indessen untersuchten NARAY-FEJES-TOTH ET AL. die Bedeutung des GR für den renalen Ionenaustausch an kortikalen Sammelrohr-Zellen des Hasen anhand von RU 28362, einem reinem GR-Agonisten, im Vergleich zu Aldosteron: Beide Liganden erhöhten die Natriumreabsorption. Zusätzlich konnte der Effekt in den mit RU 28362-behandelten Zellen durch GR-Blockade, nicht jedoch durch MR-Blockade, aufgehoben werden. So postulieren diese Wissenschaftler, dass GR-vermittelt mineralokortikoide Effekte im Nierentubulussystem anzunehmen sind [107]. Dies stützt die Hypothese der synergistischen Wirkung von MR und GR auf den Wasser-Elektrolyt-Haushalt.

Bei Zugabe von Spironolacton, einem MR-Antagonisten, wurde die MR- und GR-Expression in den natriumarm ernährten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Ratten bei salzarmer Diät stark herunterreguliert. Spironolacton ist schon lange Bestandteil der antihypertensiven Therapie [108, 109]. Auch in unserem Modell wurde

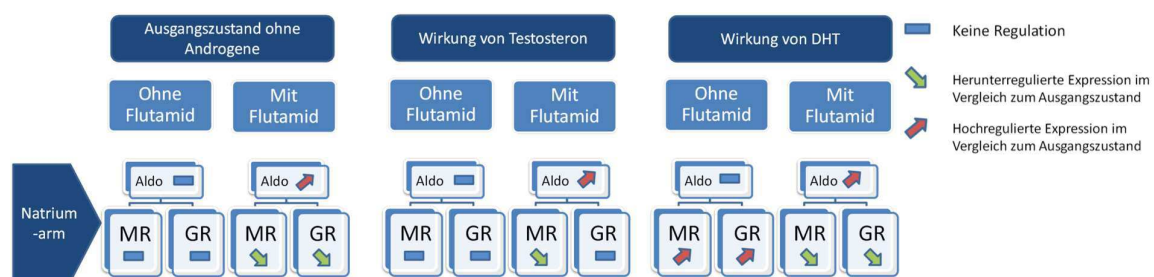


die Bedeutung des MR bei der Hypertonie-Entstehung bestätigt, indem die MR-Expression durch Spironolacton signifikant herunterreguliert wurde.

Interessant ist, dass unter Hochsalzbedingungen die GR-Expression unter Spironolactonbehandlung hochreguliert wurde, während unter Niedrigsalzbedingungen die GR-Expression supprimiert wurde. So scheint Spironolacton auf die GR-Expression bei unterschiedlichem Salzstatus gegensätzliche Wirkungen zu entfalten. Dies könnte auch klinisch Bedeutung haben. So könnte es sein, dass Spironolacton beim Menschen förderlicher unter natriumarmer Diät wirkt. Daten sind hierzu bislang nicht erhoben worden und die Effektivität von Spironolacton unter unterschiedlicher Salzbilanz beim Menschen ist letztlich nicht geklärt.

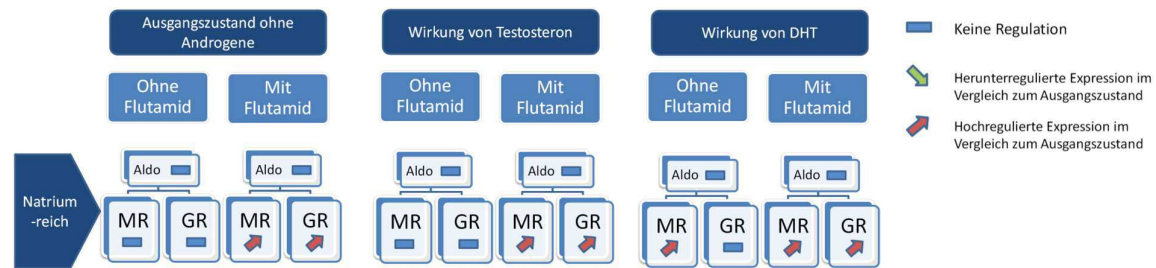
### 4.3 Androgen-abhängige Regulation des renalen MR und GR

Dem RAAS kommt eine Relevanz bei der androgen-vermittelten Hypertonie zu [63, 96, 110]. Der AR wurde sowohl in proximalen Abschnitten als auch in distalen Abschnitten des Nierentubulussystems lokalisiert [83, 84]. Deswegen interessierte uns die Wirkung der Androgene auf die MR- und GR-Expression bei unterschiedlicher Salzlast bzw. unterschiedlicher RAAS-Aktivierung (Abb. 17)



**Abb. 17: Wirkung der Androgene Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) auf MR- und GR-Expression im Vergleich zu den jeweiligen, nicht mit Androgenen behandelten Kontrolltieren.** Als Ausgangszustand diente die jeweilige Placebo-behandelte Kontrollgruppe unter natriumarmer Salzdiät (siehe auch Abb. 15). DHT nimmt stärkeren Einfluss auf die Regulation der MR- und GR- mRNA Expression als Testosteron. Aldo: Aldosteron.

In der natriumarm ernährten, mit Testosteron behandelten Gruppe, welche einen deutlichen Blutdruckanstieg zeigte, wurde keine nennenswerte Regulation der MR-Expression gesehen. Dies ließe sich durch eine schon durch den Natriummangel bedingte Heraufregulation der MR-Expression erklären. Jedoch ist für Testosteron die Induktion der Angiotensinogen-Synthese und Angiotensin II-Expression nachgewiesen geworden [50, 64]. Nichtsdestotrotz konnte in der natriumarm ernährten, mit 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron behandelten Gruppe eine deutliche Heraufregulation des MR auf das über 10-fache gemessen werden, welches mit dem Wissen um die höhere Potenz des 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterons gut korreliert.



**Abb. 18: Wirkung der Androgene Testosteron und 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) auf MR- und GR-Expression im Vergleich zu den jeweiligen, nicht mit Androgenen behandelten Kontrolltieren.** Als Ausgangszustand diente die jeweilige Placebo-behandelte Kontrollgruppe unter natriumreicher Salzdiät (siehe auch Abb. 15). DHT nimmt stärkeren Einfluss auf die Regulation der MR- und GR- mRNA Expression als Testosteron. Aldo: Aldosteron.

Unter der Hochsalzdiät kam es zu ähnlichen Ergebnissen. Dies verdeutlicht, dass die Androgene imstande sind, die MR mRNA Expression herauf zu regulieren, wobei dies hier nur für das potentere DHT zu signifikanten Ergebnissen führte. Dies ist kohärent mit den Ergebnissen der erhöhten Angiotensinogen-Expression in DHT-behandelten Ratten in der Studie von QUAN ET AL. [47].

Im Western Blot zum Nachweis der Proteinregulation des MR konnte keine eindeutig optisch erkennbare Zunahme der MR-Konzentration durch DHT nachgewiesen werden. Gleiches galt auch für den GR. Als mögliche Ursache kommen hier post-translationale Modifikationen in Frage. So ist für den MR und GR eine große Vielzahl an Koaktivatoren und –repressoren, welche deren Konformität ändern, bekannt. Beispielsweise bilden „small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) ubiquitin9“ und „steroid receptor coactivator (SRC-1)“ mit dem aktivierten MR einen Komplex. Dieser

Komplex führt zur verstärkten Transkription des ENaCs in den aldosteron-sensitiven Nephronabschnitten [78]. So variieren selbst die besten MR-Antikörper in ihrer Affinität für den MR je nach Konformation und Komplexbildung mit anderen Proteinen [111] und beeinträchtigen so die Detektion im Western Blot.

Um die Annahme einer AR-vermittelten Blutdruckregulation zu untersuchen, verglichen wir zusätzlich die mit Testosteron und DHT behandelten Wistar-Ratten mit denen mit dem jeweiligem Androgen behandelten Tieren unter gleichzeitiger Gabe von Flutamid, einem AR-Antagonisten. Hierbei konnte die Androgenwirkung auf den Blutdruck in den natriumarmen Gruppen durch die zusätzliche Gabe von Flutamid aufgehoben werden. Sowohl die MR-Expression auf mRNA als auch auf Proteinebene nahm signifikant ab.

Betrachtet man des Weiteren die Wirkung der Androgene unter Flutamid bei unterschiedlicher Salzlast, fällt auf, dass Androgene trotz Blockade des AR die Expression des MR und GR in unterschiedlichem Maße im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren der Flutamidreihe modulieren. Diese Ergebnisse können auf AR-unabhängige Effekte der Androgene zurückführbar sein. Die Signaltransduktion erfolgt beispielsweise über membranständige Rezeptoren, second messenger oder aber auch Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentration. Gut erfasst ist die schnelle nicht-genomische Modulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration über G-Proteine sowie die Aktivierung von „mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP)“ durch Testosteron in unterschiedlichen Zelltypen [112, 113]. Über diese Signalwege beeinflussen Androgene überwiegend Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung bis hin zur Apoptose von Zellen und haben insbesondere Bedeutung für die Entstehung von Tumoren. Die physiologische Bedeutung liegt noch weitestgehend im Dunkeln [114, 115]. Neuere Untersuchungen zeigten eine direkte vasodilatative Wirkung für Testosteron, welches den Blutdruck zusätzlich beeinflusst [116]. Eventuelle nicht-genomische Effekte in der Niere sind bisher nicht weiter erforscht worden.

Interessanterweise konnte unter salzarmer Diät eine deutliche Abschwächung der MR mRNA Expression bei den mit Flutamid behandelten Tieren ohne Androgenbehandlung gemessen werden, während es unter salzreicher Diät zu einer Heraufregulation kam. Diese Ergebnisse weisen auf eine AR-unabhängige Wirkung des Flutamids hin und sollen in den nächsten Kapiteln näher erörtert werden.

In dem Forschungsprojekt wurde auch deutlich, dass sowohl in der Placebogruppe als auch in der Flutamidgruppe die renale MR- und GR-Expression in ähnlicher Weise durch Androgene abhängig vom Salzstatus herauf- bzw. herunterreguliert wurden. Dies weist auf die synergistische Wirkung des GR und MR in der Niere hin. Zusätzlich zu den PCR-Analysen sahen wir auch in den Western Blot-Analysen die synergistische Regulation von MR- und GR-Proteinexpression durch Androgene abhängig von der RAAS-Aktivität. Eine der möglichen Erklärungen hierfür wäre, dass in den Aldosteron-abhängigen Zellen MR und GR nicht nur durch Homodimerisation (MR-MR und GR-GR) ihre Effekte als Transkriptionsfaktoren auf den Natriumtransport ausüben, sondern auch als Heterodimere (MR-GR) interagieren [117, 118].

#### **4.4 Heterodimer-Formation zwischen MR und GR**

Transkriptionsfaktoren, so auch die Steroidhormonrezeptoren, formen nach liganden-spezifischer Aktivierung intranukleär Dimere. Die Region für die Dimerformation liegt innerhalb des Rezeptors bzw. kann teilweise mit der ligand-bindenden Domäne überlappen. Grundsätzlich scheinen die Steroidhormonrezeptoren Homodimere zu bilden, um an spezifischen Genloki, welche das Hormon-responsive Element darstellen, zu binden. Daraufhin wird die Transkription spezifischer Zielgene entweder stimuliert oder supprimiert. Aufgrund der hohen Homologien innerhalb einer Rezeptorfamilie besitzen die Steroidrezeptoren einer Familie die Fähigkeit der Heterodimerisierung. Als Heterodimere modulieren sie gewebe- und zellspezifisch die Transkriptionsrate der Zielgene.

Unterschiedliche Studien belegten die Heterodimerbildung zwischen MR und GR sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [119]. Zusätzlich teilen MR und GR aufgrund ihrer starken Homologie Liganden, mehrere Chaperone, HREs und Transkriptions-koregulatorische Proteine. Dennoch ging man lange davon aus, dass in den renalen Zellen durch die 11 $\beta$ -HSD2, welche die Konzentration von aktivem Kortisol bzw. Kortikosteron beschränkt, der GR bzw. die Heterodimerisierung MR-GR eine untergeordnete Rolle bei der Salzhaushalt-Regulation spielt (Abb. 16). Die Erkenntnisse über die zirkadian wechselnden relativen Mengen von MR, GR und 11 $\beta$ -HSD2 sowie deren Liganden in den unterschiedlichen Nephronabschnitten führte zu einem Paradigmenwechsel [66, 72, 78]. *In vivo* und *in vitro* Studien mit variierenden

Aldosteron- und Glukokortikoidkonzentrationen deuten auf eine verstärkte Transkriptionsaktivität durch eine MR-GR Formation als durch alleinige MR-MR Formation in Bezug auf den Salztransport hin. Insbesondere die Arbeit von BERGANN ET AL. zeigte in einer humanen epithelialen Kolonzelllinie, dass der GR unabdingbar für die MR-vermittelte Induktion des ENaCs ist [120].

Auch in den Ergebnissen der hiesigen Arbeit finden die renalen Effekte durch Androgene und unterschiedliche Natriumbelastung auf den MR und GR gleichgerichtet statt. Somit wäre vorstellbar, dass der MR und GR unter Heterodimer-Formation die Natriumretention und damit auch den Blutdruck erhöhen. Dies ist jedoch nicht abschließend geklärt und könnte durch unterschiedliche Kotransfektionsexperimente in renalen Zelllinien mit spezifischen HREs näher beleuchtet werden.

#### **4.5 Androgenrezeptor-unabhängige Wirkung des Flutamids**

In dem vorliegenden Studiendesign galt es, die Wirkungen der Androgene auf die Niere in Hinblick auf die Blutdruckregulation zu untersuchen. Hierbei wurde neben den Placebo-behandelten Tieren andere mit Flutamid, einem AR-Antagonisten, behandelt [121, 122]. Somit sollten die androgenen Effekte auf die Niere aufgehoben werden. Flutamid wurde hierbei schon häufiger zur Evaluation der androgenen Effekte am kardioresnalen System in unterschiedlichen Tiermodellen genutzt [50, 85, 123, 124].

Überraschenderweise stellten wir fest, dass Flutamid unabhängig vom AR Effekte auf die Blutdruckregulation ausübt. So konnten in dem hiesigen Rattenmodell die natriuminduzierten erhöhten Blutdruckwerte in kastrierten Wistar-Ratten signifikant durch Flutamid gesenkt werden. Grundsätzlich konnte in den unterschiedlich behandelten Gruppen der Flutamidreihe zur jeweiligen behandelten Gruppe der Placeboreihe die Tendenz zur Blutdrucksenkung gesehen werden. Aufgrund der Tatsache, dass in den jeweiligen Kontrollgruppen kaum detektierbare Androgenkonzentrationen vorlagen, schließt dies auf die autonome Blutdrucksenkung des Flutamids.

So untersuchten auch BALTATU ET AL. die renale Wirkung des Flutamids in männlichen und weiblichen hypertensiven transgenen TGR(mREN2)27-Ratten mit gesteigerter RAAS-Aktivität. In dem Modell bewirkte die Flutamidbehandlung erniedrigte

Plasmareninkonzentrationen sowie eine erniedrigte renale Renin mRNA [123, 125]. Hierbei wiesen sowohl die Weibchen als auch die Männchen niedrigere Blutdruckwerte zu den jeweiligen nicht behandelten TGR(mREN2)27-Kontrolltieren auf. Dies stützt die Annahme der antihypertensiven Effekte des Flutamids durch das RAAS. Des Weiteren untersuchten sie hypertensive Ratten, welche zusätzlich eine Mutation des Androgenrezeptors (testikuläre Feminisierungsmutation tfm) aufwiesen, wodurch der AR inaktiviert wurde. Bei diesen Tieren demonstrierten sie die deutliche Abschwächung der Hypertonie und das Verhindern von histopathologischen Nierenschäden durch Flutamidbehandlung [123]. So scheint das Flutamid eigenständige AR-unabhängige Effekte in der Niere auszuüben.

So konnte auch in unseren Versuchen bei gesteigerter RAAS-Aktivität unter natriumarmer Diät die Verminderung sowohl der Transkriptionsrate als auch der Proteinexpression des MR und GR durch Flutamid hervorgerufen werden. Unter RAAS-Supprimierung war diese Wirkung durch Flutamid nicht reproduzierbar und lässt vermuten, dass Flutamid seine antihypertensive Wirkung zusätzlich über andere Mechanismen hervorruft. Unter anderem beobachteten vorausgegangene Studien die vasodilatative Wirkung von Flutamid auf sowohl die großen Kreislaufgefäße als auch die kleineren Widerstandsgefäße im Rattenmodell [126, 127]. Dies könnte ein zusätzlicher Mechanismus für die antihypertensive Wirkung des Flutamids darstellen.

Nichtsdestotrotz wurde die direkte Wirkung des Flutamids zur Blutdrucksenkung bisher nur in Tiermodellen demonstriert und bedarf der ausgiebigeren Evaluierung beim Menschen, um diese unter Berücksichtigung der anti-androgenen Effekte therapeutisch nutzen zu können.

#### **4.6 Regulation des MR-Zielgens TGF- $\beta$ 1 in der Niere**

TGF- $\beta$ 1 wird als eines der Zielgene des Aldosteron-MR-Komplexes und als möglicher Signalweg für chronische Nierenschäden durch Fibrose und Kollagenbildung diskutiert [128, 129]. Mehrere Studien belegen, dass durch MR-Blockade mittels Spironolacton eine deutliche Verminderung der Inflammation und Fibrose sowie ein Rückgang der TGF- $\beta$ 1-Expression in unterschiedlichen Geweben zu beobachten war [130-132].

METCALFE ET AL. zeigten bei induzierter renaler Obstruktion in adulten Sprague-Dawley-Ratten eine Verstärkung der renalen Apoptose und Fibrose durch Testosteron. Gleichzeitig wiesen die mit Testosteron behandelten ovariectomierten sowie die intakten männlichen Ratten deutlich höhere TGF $\beta$ 1-Konzentrationen als kastrierte männliche und intakte weibliche Ratten auf [133]. Dies könnte auf eine mögliche Wirkung von Testosteron auf das MR-vermittelte Remodelling in der Niere hinweisen. Jedoch ist zu betonen, dass Grundlage des hiesigen Studiendesigns nicht die Erzeugung eines (z. B. fibrotischen) Krankheitsmodells war. Die Tiere wurden für einen relativ kurzen Zeitraum mit Androgenen substituiert, um die physiologische Bedeutung für die Blutdruckregulation zu untersuchen. Umbau- und Fibroseprozesse stellen jedoch häufig langfristige Folgen von pathologischen Situationen dar.

In den von uns erhobenen Daten konnte eine signifikant erhöhte renale TGF- $\beta$ 1-Expression durch das potentere Androgen 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron in den natriumreich ernährten Tieren nachgewiesen werden. Für Testosteron konnte keine signifikante Regulation gesehen werden. Auch die MR mRNA war lediglich für die DHT-Gruppe unter der Hochsalzdiät signifikant hochreguliert, nicht jedoch bei Testosteronbehandlung. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass unserem Studiendesign kein Krankheitsmodell zugrunde liegt.

Überraschenderweise zeigte die Zugabe von Flutamid für alle mit Flutamid behandelten Tiere einen deutlichen, über 50-fachen Anstieg der TGF- $\beta$ 1 Expression im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren unabhängig von der Salzzufuhr. Hierfür könnte die Zunahme der Aldosteronkonzentration durch Flutamid verantwortlich sein, wie wir sie in den natriumarm ernährten Tieren bestimmt haben. Jedoch war die Serum-Aldosteronkonzentration unter natriumreicher Ernährung supprimiert. Dies lässt vermuten, dass die renale TGF- $\beta$ 1 Regulation nicht allein durch die Aldosteron-MR-Achse in der Niere beeinflusst wird. Da in allen Flutamid-behandelten Tieren eine stark erhöhte TGF- $\beta$ 1 mRNA Expression gemessen wurde, könnte Flutamid die Heraufregulation induziert haben. KOCH ET AL. postulierten antiproliferative Effekte des Flutamids als Ligand des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors vermittelt über die Induktion von TGF- $\beta$ 1 [134].

CARVAJAL ET AL. wiederum verglichen Patienten mit primärem Aldosteronismus mit Patienten mit essentieller Hypertonie und postulierten eine hemmende Wirkung des Aldosterons auf die TGF- $\beta$ 1-Expression im Herzen. Des Weiteren zeigte sich ein

Anstieg von TGF- $\beta$ 1 unter Spironolacton bei Patienten mit essentieller Hypertonie. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 als womöglich protektiver Faktor auf das Remodelling am Herzen diskutiert [135].

Im Gegensatz dazu postulierten KAKOKI ET AL. eine direkte Wirkung des TGF- $\beta$ 1 bei der Blutdruckkontrolle und Flüssigkeitshomöostase. Sie stellten die hemmende Wirkung des TGF- $\beta$ 1 auf die Aldosteron- sowie Kortikosteronproduktion fest, indem sie transgene Mäuse mit variierender TGF- $\beta$ 1 mRNA Expression in Abstufungen von ~10-300 % des Normalen züchteten. Hierbei hatten die Mäuse mit ~10 % TGF- $\beta$ 1 mRNA Expression einen deutlich höheren Blutdruck als die Wildtyp-Mäuse. Durch die Behandlung mit dem MR-Antagonisten Spironolacton konnten die Hypertonie und das Plasma-Aldosteron normalisiert werden [136, 137].

Somit ist durchaus denkbar, dass TGF- $\beta$ 1 eine modulierende Rolle bei der Blutdruckregulation spielt. Jedoch herrscht noch Uneinigkeit hinsichtlich des Zusammenspiels zwischen Aldosteron, MR und TGF- $\beta$ 1, ihrer molekularen Interaktion und einer beteiligten Nierenzellschädigung. Unser Studiendesign lässt in der Tat ebenfalls keine Rückschlüsse zu, inwiefern diese sich im Nierengewebe gegenseitig beeinflussen. Eine gleichgesinnte Ausrichtung der TGF- $\beta$ 1-Regulation analog zum MR war nicht durch Natrium und lediglich für DHT in den erhobenen Daten der vorgelegten Arbeit ersichtlich. So deuten unsere Ergebnisse primär auf eine renale Regulation des TGF- $\beta$ 1 unabhängig von der Aldosteron-MR-Achse hin.

#### **4.7 Limitationen der Arbeit**

Diskrepanzen zu Ergebnissen anderer Studien können durch unterschiedliche Konzentrationen der Natrium- und Androgenbehandlung sowie durch einen anderen Versuchszeitraum, Alter und Rattenstamm bedingt sein. So zeigten HINOJOSA-LABORDE ET AL. bei einer natriumreichen Diät mit 8 % NaCl, dass männliche intakte Dahl-Ratten in einem Behandlungszeitraum von 14 Tagen im Vergleich zu den weiblichen deutlich höhere Blutdruckwerte entwickelten [138]. In unserer Versuchsreihe bewirkten eine natriumreiche Diät von 4 % und die zusätzliche Gabe von Testosteron bzw. DHT in den gonadektomierten Wistar-Ratten keinen weiteren Blutdruckanstieg im Vergleich zu den gonadektomierten Kontrolltieren der



natriumreichen Gruppe. Dafür kann zusätzlich die Anzahl an Tieren in der jeweiligen Gruppe zu niedrig in dem Studiendesign angelegt gewesen sein. Außerdem muss auch die postulierte protektive Wirkung der Östrogene auf die renale Blutdruckregulation in weiblichen Versuchstieren berücksichtigt werden. Dies könnte die deutlicheren Unterschiede in den Blutdruckwerten bei HINOJOSA-LABORDE ET AL. unter erhöhter Salzlast erklären [139-141].

Zu berücksichtigen ist, dass die erhobenen Daten die Wirkung der Androgene sowie der Salzlast auf den renalen MR und GR an Nieren-Gesamtgewebe widerspiegeln. Sicherlich ist darüber hinaus wichtig, an welchen Punkten des Nierentubulussystems die Wirkung der jeweiligen Metabolite ansetzt. Dabei wäre die Untersuchung der Androgenwirkung auf die einzelnen Nierensegmente aufschlussreich. So gehen QUAN ET AL. von einer erhöhten Salzretention durch Androgene im proximalen Tubulus aus, während die natriumabhängige Salzreabsorption durch den MR und GR hauptsächlich in den distalen Abschnitten des Tubulussystems zum Tragen zu kommen scheint [47]. Dies können wir aber in unserem Modell nicht unterscheiden.

Die große Vielfalt an Messmethoden während unterschiedlicher Behandlungszeiträume, die in den tierexperimentellen Studien zum Tragen kommen, führen zu weiteren Differenzen in den Ergebnissen. So analysierte COGSWELL ET AL. mögliche Fehlerquellen bei der Abschätzung der Salzbelastung im Organismus und damit einhergehende Fehlinterpretationen in Bezug auf das kardirenale Risiko. Gleichzeitig stellten sie Kriterien zur zukünftigen Minimierung von Fehlmessungen und -interpretationen anlehnend an die klassische Kausalitätsprüfung nach HILL ET AL. auf [142, 143]. So ist beispielsweise gängiger Standard, die Natriumexkretion beim Menschen im ein- bis zweimaligen 24-Stunden-Sammelurin zu messen, in der Annahme, dass überschüssiges Natrium innerhalb von 24 Stunden nach Aufnahme über die Nieren ausgeschieden wird. Doch spiegelt der 24-Stunden-Sammelurin nur ca. 40% der mittleren Langzeit-Natriumausscheidung einer Person wider. Die Natriumeliminierung scheint ebenfalls wie Aldosteron und Kortisol nicht nur einer zirkadianen Rhythmik, sondern auch längerfristiger Rhythmen zu unterliegen [144]. So können erst mehrfache, nicht-aufeinanderfolgende 24-Stunden-Sammelurinproben zu adäquaten Schlussfolgerungen zur Natriumzufuhr des Individuums gezogen und anschließend in Zusammenhang mit einem kardiovaskulären Risiko gesetzt werden [142]. Daten bezüglich tierexperimenteller Studienlage gibt es hierzu bislang nicht.

---

Unter anderem ist auch die Korrelation der mRNA Expression zu Proteinkonzentration und -aktivität mit Vorsicht zu beurteilen. VOGEL UND MARCOTTE weisen auf eine ungefähr 60%-ige Korrelation zwischen Genexpression und Proteinproduktion für die meisten Gene hin. Hierbei machen sie auf die Bedeutung von posttranskriptionalen und -translationalen Regulationsmechanismen, welche letztendlich die Proteinkonzentration und -aktivität bestimmen, aufmerksam [145]. So ist bei den Steroidrezeptoren bekannt, dass sie durch Phosphorylierung und Hitzeschock-Proteine in aktiven und inaktiven Konformationen vorliegen können. Somit wird je nach Konformationszustand die Translokation vom Zytosol ins Kerninnere verhindert bzw. begünstigt [78, 146].

## 5 Fazit und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Testosteron und dem stärker wirksamen Metaboliten 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron auf die renale MR- und GR-Expression am Rattenmodell zu untersuchen. Weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung der Wechselwirkungen von Androgenen und unterschiedlichem Salzstatus auf die Regulation des MR und GR, da insbesondere in den westlichen Industrieländern ein erhöhter Salzkonsum besteht.

Dabei bewirkte die salzreiche Diät bei den Ratten eine signifikante Herunterregulation sowohl des MR als auch des GR. Unter zusätzlicher Hormonstimulation mit Androgenen konnte eine Heraufregulation sowohl bei salzarmer als auch bei salzreicher Diät nur für das potentere DHT signifikant gezeigt werden. Hierbei ist bekannt, dass Testosteron gewebespezifisch auch zu Östradiol aromatisiert werden kann. Des Weiteren war der Effekt unter salzreichen Bedingungen deutlich abgeschwächt. So sind Androgene im Stande, in die Regulation des mineralokortikoiden Systems und den damit verbundenen Veränderungen des Blutdruckes und des Nierengewichts einzugreifen.

Überraschenderweise konnten wir unter der AR-Blockade durch Flutamid sehen, dass Androgene unter Umgehung des AR und in Abhängigkeit des Salzstatus auch die MR- und GR-Expression zu beeinflussen vermögen. Hierbei wurde insbesondere unter einer Hochsalzdiät die MR- und GR-Expression signifikant verstärkt, während unter Nidrigsalzdiät die Expression unterhalb der mit Placebo behandelten Kontrollgruppe lag. So wurde auch der Rückgang der Blutdruckwerte durch Flutamid bei den mit Androgenen behandelten im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Wistar-Ratten lediglich für die natriumarm ernährten Tiere signifikant nachgewiesen. Möglicherweise kommen so auch nicht-genomische Mechanismen bzw. direkte Effekte durch Androgene in der Niere zum Tragen. Bei zusätzlich erhöhter Salzlast konnte die direkte androgene Wirkung auf die MR- und GR-Expression verstärkt werden. Nicht-genomische Effekte der Androgene auf das kardiovaskuläre System stellen somit einen bislang unzureichend ergründeten Aspekt in der Bedeutung auf die Blutdruckregulation dar. Um diese nicht-genomische Wirkung der Androgene in der Niere zu verifizieren, könnte man ein gewebe-spezifisches AR *knockout* (ARKO)-Modell heranziehen.

Androgene und der Grad der Natriumzufuhr beeinflussen die MR- und GR-Expression in der Niere gleichgerichtet. Dies veranlasst zu einem Paradigmenwechsel und widerspricht der überwiegenden Lehransicht, dass der Natrium- und Volumenhaushalt ausschließlich durch das mineralokortikoide System in der Niere bestimmt wird. So lässt die variierende GR-Expression durch Natrium und Androgene auf eine physiologische Funktion bei der Regulation des Salz- und Wasserhaushalts schließen.

Gleichzeitig konnten die vorliegenden Ergebnisse eine suppressive Wirkung des Flutamids selbst auf das mineralokortikoide System nachweisen. Somit kann Flutamid selbst auf die Blutdruckregulation einwirken und so für eine verstärkte Blutdrucksenkung verantwortlich sein. Bislang wird Flutamid hauptsächlich in der Therapie des Prostatakarzinoms und bei der Hyperandrogenämie der Frau eingesetzt. Die antihypertensiven und nierenprotektiven Effekte von Flutamid müssten in einer umfangreichen klinischen Kohortenstudie bestätigt werden, um sich ihr therapeutisches Potential auch in der Humanmedizin zu Nutze zu machen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass Androgene die RAAS-Aktivität in der Niere modulieren können. Auch AR-unabhängige Mechanismen scheinen hier eine entscheidende Relevanz zu haben. Zusätzlich kristallisierte sich die gleichgerichtete Regulation von MR und GR in der Aufrechterhaltung der Natrium-Wasser-Homöostase heraus und indiziert eine relevante Rolle des GR in der Regulation dieses Gleichgewichts, nicht nur unter pathologischen Umständen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen.

Durch besseres Verständnis der ortsspezifischen und nicht-genomischen Androgenwirkung kann die Niere, welche heute schon Ansatz vieler Medikamente bei der Therapie der arteriellen Hypertonie sind, Fokus einer geschlechtsspezifischen Hypertonietherapie sein.

## 6 Literatur

1. Organization WH. *New data highlight increases in hypertension, diabetes incidence*. 2012, WHO.
2. Neuhauser H, Thamm M, Ellert U. *Blutdruck in Deutschland 2008–2011*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 795-801.
3. Council ES, Redon J, Narkiewicz K, Nilsson PM, Burnier M, Viigimaa M, Ambrosioni E, Coca A, Olsen MH, Schmieder RE. *2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension*. European Heart Journal, 2013. **34**: p. 2159-2219.
4. Kannel WB. *Role of blood pressure in cardiovascular disease: the Framingham Study*. Angiology, 1975. **26**(1 Pt. 1): p. 1-14.
5. Turnbull F, Kengne AP, MacMahon S. *Blood pressure and cardiovascular disease: tracing the steps from Framingham*. Prog Cardiovasc Dis, 2010. **53**(1): p. 39-44.
6. *Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 35-64 years. The WHO MONICA Project*. World Health Stat Q, 1988. **41**(3-4): p. 115-40.
7. Luke RG. *Hypertensive nephrosclerosis: pathogenesis and prevalence. Essential hypertension is an important cause of end-stage renal disease*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14**(10): p. 2271-8.
8. Waeber B, de la Sierra A, Ruilope LM. *Target organ damage: how to detect it and how to treat it?* J Hypertens Suppl, 2009. **27**(3): p. S13-8.
9. Neuhauser H, Thamm M, Ellert U. *[Blood pressure in Germany 2008-2011: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 795-801.
10. Sandberg K, Ji H. *Sex differences in primary hypertension*. Biol Sex Differ, 2012. **3**(1): p. 7.
11. Cutler JA, Sorlie PD, Wolz M, Thom T, Fields LE, Roccella EJ. *Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988–1994 and 1999–2004*. Hypertension, 2008. **52**(5): p. 818-827.
12. August P. *Hypertension in men*. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1999. **84**(10): p. 3451-3454.
13. Meisinger C, Heier M, Völzke H, Löwel H, Mitusch R, Hense H-W, Lüdemann J. *Regional disparities of hypertension prevalence and management within Germany*. Journal of hypertension, 2006. **24**(2): p. 293-299.
14. Erbel R, Möhlenkamp S, Lehmann N, Schermund A, Moebus S, Stang A, Dragano N, Hoffmann B, Grönemeyer D, Seibl R. *Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Zeichen subklinischer Atherosklerose*. Deutsches Ärzteblatt, 2008. **105**: p. 1-8.
15. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. *Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5): p. 650-655.
16. Wiinberg N, Hoegholm A, Christensen HR, Bang LE, Mikkelsen KL, Nielsen PE, Svendsen TL, Kampmann JP, Madsen NH, Bentzon MW. *24-h ambulatory*

- blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender.* Am J Hypertens, 1995. **8**(10 Pt 1): p. 978-86.
17. Lima R, Wofford M, Reckelhoff JF. *Hypertension in postmenopausal women.* Curr Hypertens Rep, 2012. **14**(3): p. 254-60.
  18. Roberts J, Maurer K. *Blood pressure levels of persons 6-74 years.* 1977: US Government Printing Office.
  19. Chen Y-F. *Sexual dimorphism of hypertension.* Current opinion in nephrology and hypertension, 1996. **5**(2): p. 181-185.
  20. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. *Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system.* Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 480-3.
  21. Bachmann J, Feldmer M, Ganten U, Stock G, Ganten D. *Sexual dimorphism of blood pressure: possible role of the renin-angiotensin system.* The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 1991. **40**(4): p. 511-IN2.
  22. Van Liere EJ, Stickney JC, Marsh DF. *Sex Differences in Blood Pressure of Dogs.* Science, 1949. **109**(2837): p. 489.
  23. Reckelhoff JF, Zhang H, Granger JP. *Testosterone exacerbates hypertension and reduces pressure-natriuresis in male spontaneously hypertensive rats.* Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 435-9.
  24. Chen Y-F, Meng Q-C. *Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent.* Life sciences, 1991. **48**(1): p. 85-96.
  25. Toh S, Hernandez-Diaz S, Logan R, Rossouw JE, Hernan MA. *Coronary heart disease in postmenopausal recipients of estrogen plus progestin therapy: does the increased risk ever disappear? A randomized trial.* Ann Intern Med, 2010. **152**(4): p. 211-7.
  26. Howard BV, Rossouw JE. *Estrogens and cardiovascular disease risk revisited: the Women's Health Initiative.* Curr Opin Lipidol, 2013. **24**(6): p. 493-9.
  27. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N, Group HR. *Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II).* JAMA, 2002. **288**(1): p. 49-57.
  28. Mironova TF, Mironov VA, Nuzhdina EV. *[Peripheral Autonomous Regulation of Sinus (Sinoatrial) Node in Type 1 and 2 Diabetes Mellitus].* Klin Med (Mosk), 2015. **93**(4): p. 38-46.
  29. Shibata S, Fujita T. *The kidneys and aldosterone/mineralocorticoid receptor system in salt-sensitive hypertension.* Current hypertension reports, 2011. **13**(2): p. 109-115.
  30. Organization WH. *Fact sheet: Salt reduction.* 2016; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs393/en/>.
  31. Chiolero A, Würzner G, Burnier M. *Renal determinants of the salt sensitivity of blood pressure.* Nephrology Dialysis Transplantation, 2001. **16**(3): p. 452-458.
  32. Midgley JP, Matthew AG, Greenwood CM, Logan AG. *Effect of reduced dietary sodium on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials.* Jama, 1996. **275**(20): p. 1590-7.
  33. He FJ, Li J, Macgregor GA. *Effect of longer term modest salt reduction on blood pressure: Cochrane systematic review and meta-analysis of randomised trials.* Bmj, 2013. **346**: p. f1325.
  34. Adler AJ, Taylor F, Martin N, Gottlieb S, Taylor RS, Ebrahim S. *Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease.* Cochrane Database Syst Rev, 2014. **12**: p. Cd009217.

35. Graudal NA, Hubeck-Graudal T, Jurgens G. *Effects of low-sodium diet vs. high-sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride (Cochrane Review)*. Am J Hypertens, 2012. **25**(1): p. 1-15.
36. Clark JL, Rech L, Chaity N, Sihag J, Taylor CG, Aliani M. *Possible deleterious hormonal changes associated with low-sodium diets*. Nutr Rev, 2015. **73**(1): p. 22-35.
37. Graudal NA, Galløe AM, Garred P. *Effects of sodium restriction on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride: a meta-analysis*. Jama, 1998. **279**(17): p. 1383-1391.
38. Weinberger MH. *Salt sensitivity of blood pressure in humans*. Hypertension, 1996. **27**(3): p. 481-490.
39. Dahl LK, Heine M, Tassinari L. *Effects of chronic excess salt ingestion Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension*. The Journal of experimental medicine, 1962. **115**(6): p. 1173-1190.
40. Weinberger MH, Miller JZ, Luft FC, Grim CE, Fineberg NS. *Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance*. Hypertension, 1986. **8**(6 Pt 2): p. II127.
41. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Scheel KW, Manning RD, Norman RA. *Arterial pressure regulation: overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension*. The American journal of medicine, 1972. **52**(5): p. 584-594.
42. Kusche-Vihrog K, Oberleithner H. *An emerging concept of vascular salt sensitivity*. F1000 Biol Rep, 2012. **4**: p. 20.
43. Skrabal F, Herholz H, Neumayr M, Hamberger L, Ledochowski M, Sporer H, Hortnagl H, Schwarz S, Schonitzer D. *Salt sensitivity in humans is linked to enhanced sympathetic responsiveness and to enhanced proximal tubular reabsorption*. Hypertension, 1984. **6**(2 Pt 1): p. 152-8.
44. Nishimoto M, Fujita T. *Renal mechanisms of salt-sensitive hypertension: contribution of two steroid receptor-associated pathways*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **308**(5): p. F377-87.
45. Geering K, Claire M, Gaeggeler H-P, Rossier BC. *Receptor occupancy vs. induction of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup> transport by aldosterone*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1985. **248**(1): p. C102-C108.
46. Hunter RW, Ivy JR, Bailey MA. *Glucocorticoids and renal Na<sup>+</sup> transport: implications for hypertension and salt sensitivity*. J Physiol, 2014. **592**(8): p. 1731-44.
47. Quan A, Chakravarty S, Chen J-K, Chen J-C, Loleh S, Saini N, Harris RC, Capdevila J, Quigley R. *Androgens augment proximal tubule transport*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2004. **287**(3): p. F452-F459.
48. Liu B, Ely D. *Testosterone increases: sodium reabsorption, blood pressure, and renal pathology in female spontaneously hypertensive rats on a high sodium diet*. Adv Pharmacol Sci, 2011. **2011**: p. 817835.
49. Reckelhoff JF. *Gender differences in the regulation of blood pressure*. Hypertension, 2001. **37**(5): p. 1199-208.
50. Reckelhoff JF, Granger JP. *Role of androgens in mediating hypertension and renal injury*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(2): p. 127-31.
51. Hu J, Tan S, Zhong Y. *Effects of Testosterone on Renal Function in Salt-Loaded Rats*. The American Journal of the Medical Sciences, 2011. **342**(1): p. 38-43.

52. Chen M-J, Yang W-S, Yang J-H, Chen C-L, Ho H-N, Yang Y-S. *Relationship between androgen levels and blood pressure in young women with polycystic ovary syndrome*. Hypertension, 2007. **49**(6): p. 1442-1447.
53. Kindermann W. [*Cardiovascular side effects of anabolic-androgenic steroids*]. Herz, 2006. **31**(6): p. 566-73.
54. Grace F, Sculthorpe N, Baker J, Davies B. *Blood pressure and rate pressure product response in males using high-dose anabolic androgenic steroids (AAS)*. Journal of Science and Medicine in Sport, 2003. **6**(3): p. 307-312.
55. Achar S, Rostamian A, Narayan SM. *Cardiac and metabolic effects of anabolic-androgenic steroid abuse on lipids, blood pressure, left ventricular dimensions, and rhythm*. The American journal of cardiology, 2010. **106**(6): p. 893-901.
56. Kienitz T, Quinkler M. *Testosterone and blood pressure regulation*. Kidney Blood Press Res, 2008. **31**(2): p. 71-9.
57. Wu CC, Schwartzman ML. *The role of 20-HETE in androgen-mediated hypertension*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011. **96**(1-4): p. 45-53.
58. Wu CC, Cheng J, Zhang FF, Gotlinger KH, Kelkar M, Zhang Y, Jat JL, Falck JR, Schwartzman ML. *Androgen-dependent hypertension is mediated by 20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid-induced vascular dysfunction: role of inhibitor of kappaB Kinase*. Hypertension, 2011. **57**(4): p. 788-94.
59. Sabolic I, Asif AR, Budach WE, Wanke C, Bahn A, Burckhardt G. *Gender differences in kidney function*. Pflugers Arch, 2007. **455**(3): p. 397-429.
60. James GD, Sealey JE, Muller F, Alderman M, Madhavan S, Laragh JH. *Renin relationship to sex, race and age in a normotensive population*. J Hypertens Suppl, 1986. **4**(5): p. S387-9.
61. Quinkler M, Bujalska IJ, Kaur K, Onyimba CU, Buhner S, Allolio B, Hughes SV, Hewison M, Stewart PM. *Androgen Receptor-Mediated Regulation of the  $\alpha$ -Subunit of the Epithelial Sodium Channel in Human Kidney*. Hypertension, 2005. **46**(4): p. 787-798.
62. Kienitz T, Allolio B, Strasburger C, Quinkler M. *Sex-specific regulation of ENaC and androgen receptor in female rat kidney*. Hormone and metabolic research, 2009. **41**(05): p. 356-362.
63. Ellison KE, Ingelfinger JR, Pivor M, Dzau VJ. *Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression*. Journal of Clinical Investigation, 1989. **83**(6): p. 1941.
64. Yanes LL, Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Romero DG, Racusen LC, Zhang H, Reckelhoff JF. *Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(4): p. F771-9.
65. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R, Rintelen H. *Physiologie*. 2008: Elsevier, Urban&FischerVerlag.
66. Ackermann D, Gresko N, Carrel M, Loffing-Cueni D, Habermehl D, Gomez-Sanchez C, Rossier BC, Loffing J. *In vivo nuclear translocation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat kidney: differential effect of corticosteroids along the distal tubule*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **299**(6): p. F1473-85.
67. Fuller PJ. *The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity*. FASEB J, 1991. **5**(15): p. 3092-9.
68. Chen S-y, Wang J, Yu G-q, Liu W, Pearce D. *Androgen and Glucocorticoid Receptor Heterodimer Formation A POSSIBLE MECHANISM FOR MUTUAL INHIBITION OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(22): p. 14087-14092.



69. Grossmann C, Ruhs S, Langenbruch L, Mildenerger S, Stratz N, Schumann K, Gekle M. *Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling*. Chem Biol, 2012. **19**(6): p. 742-51.
70. Bailey MA, Mullins JJ, Kenyon CJ. *Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors stimulate epithelial sodium channel activity in a mouse model of Cushing syndrome*. Hypertension, 2009. **54**(4): p. 890-896.
71. Gaeggeler H-P, Gonzalez-Rodriguez E, Jaeger NF, Loffing-Cueni D, Norregaard R, Loffing J, Horisberger J-D, Rossier BC. *Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line*. Journal of the American Society of Nephrology, 2005. **16**(4): p. 878-891.
72. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated*. Science, 1988. **242**(4878): p. 583-585.
73. Pujols L, Mulla J, Roca-Ferrer J, Torrego A, Xaubet A, Cidlowski JA, Picado C. *Expression of glucocorticoid receptor alpha- and beta-isoforms in human cells and tissues*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(4): p. C1324-31.
74. Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. *Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats*. Kidney international, 2003. **63**(5): p. 1791-1800.
75. Young MJ. *Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation*. Current opinion in nephrology and hypertension, 2008. **17**(2): p. 174-180.
76. Rocha R, Stier Jr CT, Kifor I, Ochoa-Maya MR, Rennke HG, Williams GH, Adler GK. *Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy*. Endocrinology, 2000. **141**(10): p. 3871-3878.
77. Oakley RH, Cidlowski JA. *The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013. **132**(5): p. 1033-1044.
78. Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. *The multifaceted mineralocorticoid receptor*. Compr Physiol, 2014. **4**(3): p. 965-94.
79. Pascual-Le Tallec L, Lombès M. *The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action*. Molecular endocrinology, 2005. **19**(9): p. 2211-2221.
80. Pratt WB, Toft DO. *Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones 1*. Endocrine reviews, 1997. **18**(3): p. 306-360.
81. Farman N, Oblin M, Lombes M, Delahaye F, Westphal H, Bonvalet J, Gasc J. *Immunolocalization of gluco- and mineralocorticoid receptors in rabbit kidney*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1991. **260**(2): p. C226-C233.
82. Farman N, Rafestin-Oblin M-E. *Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2001. **280**(2): p. F181-F192.
83. Pelletier G. *Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues*. Histochemistry, 2000. **15**(4): p. 1261-70.
84. Boulkroun S, Le Moellie C, Blot-Chabaud M, Farman N, Courtois-Coutry N. *Expression of androgen receptor and androgen regulation of NDRG2 in the rat renal collecting duct*. Pflugers Arch, 2005. **451**(2): p. 388-94.
85. Hofmann PJ, Michaelis M, Gotz F, Bartel C, Kienitz T, Quinkler M. *Flutamide increases aldosterone levels in gonadectomized male but not female Wistar rats*. Am J Hypertens, 2012. **25**(6): p. 697-703.

86. Michaelis M, Hofmann PJ, Gotz F, Bartel C, Kienitz T, Quinkler M. *Sex-specific effects of spironolactone on blood pressure in gonadectomized male and female Wistar rats*. Horm Metab Res, 2012. **44**(4): p. 291-5.
87. Pfaffl MW. *Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum, 2004. **1**(10): p. 92-5.
88. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
89. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
90. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
91. Ghanadian R, Lewis JG, Chisholm GD. *Serum testosterone and dihydrotestosterone changes with age in rat*. Steroids, 1975. **25**(6): p. 753-762.
92. Saksena S, Lau I. *Variations in serum androgens, estrogens, progestins, gonadotropins and prolactin levels in male rats from prepubertal to advanced age*. Experimental aging research, 1979. **5**(3): p. 179-194.
93. Simpkins J, Kalra P, Kalra S. *Alterations in daily rhythms of testosterone and progesterone in old male rats*. Experimental aging research, 1981. **7**(1): p. 25-32.
94. HARRIS ME, Bartke A. *Concentration of Testosterone in Testis Fluid of the Rat 1*. Endocrinology, 1974. **95**(3): p. 701-706.
95. Badr FM, Bartke A. *Effect of ethyl alcohol on plasma testosterone level in mice*. Steroids, 1974. **23**(6): p. 921-928.
96. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. *Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats role of the renin-angiotensin system*. Hypertension, 2000. **35**(1): p. 480-483.
97. Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K, Granger JP. *Gender differences in hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of androgens and androgen receptor*. Hypertension, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 920-3.
98. Pfeiffer CA, Emmel VM, Gardner WU. *Renal hypertrophy in mice receiving estrogens and androgens*. The Yale journal of biology and medicine, 1940. **12**(5): p. 493.
99. Hu J, Tan S, Zhong Y. *Effects of testosterone on renal function in salt-loaded rats*. Am J Med Sci, 2011. **342**(1): p. 38-43.
100. Borg B, Antonopoulou E, Andersson E, Carlberg T, Mayer I. *Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus**. Canadian Journal of Zoology, 1993. **71**(11): p. 2327-2329.
101. Mironova E, Boiko N, Bugaj V, Kucher V, Stockand JD. *Regulation of Na<sup>+</sup> excretion and arterial blood pressure by purinergic signalling intrinsic to the distal nephron: consequences and mechanisms*. Acta Physiol (Oxf), 2015. **213**(1): p. 213-21.
102. Gaeggeler HP, Gonzalez-Rodriguez E, Jaeger NF, Loffing-Cueni D, Norregaard R, Loffing J, Horisberger JD, Rossier BC. *Mineralocorticoid versus glucocorticoid receptor occupancy mediating aldosterone-stimulated sodium transport in a novel renal cell line*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 878-91.

103. Hunter RW, Ivy JR, Bailey MA. *Glucocorticoids and renal Na<sup>+</sup> transport: implications for hypertension and salt sensitivity*. J Physiol, 2014. **592**(Pt 8): p. 1731-44.
104. Warnock DG. *Aldosterone-related genetic effects in hypertension*. Curr Hypertens Rep, 2000. **2**(3): p. 295-301.
105. Cicala MV, Mantero F. *Hypertension in Cushing's syndrome: from pathogenesis to treatment*. Neuroendocrinology, 2010. **92 Suppl 1**: p. 44-9.
106. Rickard AJ, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. *The role of the glucocorticoid receptor in mineralocorticoid/salt-mediated cardiac fibrosis*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5901-6.
107. Naray-Fejes-Toth A, Fejes-Toth G. *Glucocorticoid receptors mediate mineralocorticoid-like effects in cultured collecting duct cells*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 1990. **259**(4): p. F672-F678.
108. Jeunemaitre X, Chatellier G, Kreft-Jais C, Charru A, Devries C, Plouin P-F, Corvol P, Menard J. *Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension*. The American journal of cardiology, 1987. **60**(10): p. 820-825.
109. Steelman S, Brooks J, Morgan E, Patanelli D. *Anti-androgenic activity of spironolactone*. Steroids, 1969. **14**(4): p. 449.
110. Komukai K, Mochizuki S, Yoshimura M. *Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system*. Fundamental & clinical pharmacology, 2010. **24**(6): p. 687-698.
111. Gomez-Sanchez CE, de Rodriguez AF, Romero DG, Estess J, Warden MP, Gomez-Sanchez MT, Gomez-Sanchez EP. *Development of a panel of monoclonal antibodies against the mineralocorticoid receptor*. Endocrinology, 2006. **147**(3): p. 1343-1348.
112. Benten WPM, Lieberherr M, Sekeris CE, Wunderlich F. *Testosterone induces Ca<sup>2+</sup> influx via non-genomic surface receptors in activated T cells*. FEBS letters, 1997. **407**(2): p. 211-214.
113. Estrada M, Espinosa A, Muller M, Jaimovich E. *Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells*. Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3586-97.
114. Foradori CD, Weiser MJ, Handa RJ. *Non-genomic Actions of Androgens*. Frontiers in neuroendocrinology, 2008. **29**(2): p. 169-181.
115. Heinlein CA, Chang C. *The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(10): p. 2181-7.
116. Perusquía M, Greenway CD, Perkins LM, Stallone JN. *Systemic hypotensive effects of testosterone are androgen structure-specific and neuronal nitric oxide synthase-dependent*. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2015. **309**(2): p. R189-R195.
117. Ou XM, Storrington JM, Kushwaha N, Albert PR. *Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14299-307.
118. Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA, Hache RJ. *Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 781-93.

119. Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D. *Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(26): p. 12480-12484.
120. Bergann T, Fromm A, Borden SA, Fromm M, Schulzke JD. *Glucocorticoid receptor is indispensable for physiological responses to aldosterone in epithelial Na<sup>+</sup> channel induction via the mineralocorticoid receptor in a human colonic cell line*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(5): p. 432-9.
121. PEETS EA, FAYE HENSON M, NERI R. *On the Mechanism of the Antiandrogenic Action of Flutamide ( $\alpha$ - $\alpha$ -Trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionoluidide) in the Rat*. Endocrinology, 1974. **94**(2): p. 532-540.
122. Kemppainen JA, Lane MV, Sar M, Wilson EM. *Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. Specificity for steroids and antihormones*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(2): p. 968-974.
123. Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, Andreev D, Jordan C, Bader M. *Abolition of hypertension-induced end-organ damage by androgen receptor blockade in transgenic rats harboring the mouse ren-2 gene*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(11): p. 2681-7.
124. Ely DL, Salisbury R, Hadi D, Turner M, Johnson ML. *Androgen receptor and the testes influence hypertension in a hybrid rat model*. Hypertension, 1991. **17**(6 Pt 2): p. 1104-1110.
125. Baltatu O, Cayla C, Iliescu R, Andreev D, Bader M. *Abolition of end-organ damage by antiandrogen treatment in female hypertensive transgenic rats*. Hypertension, 2003. **41**(3 Pt 2): p. 830-3.
126. Ba ZF, Wang P, Kuebler JF, Rue LW, 3rd, Bland KI, Chaudry IH. *Flutamide induces relaxation in large and small blood vessels*. Arch Surg, 2002. **137**(10): p. 1180-6.
127. Iliescu R, Campos LA, Schlegel WP, Morano I, Baltatu O, Bader M. *Androgen receptor independent cardiovascular action of the antiandrogen flutamide*. J Mol Med (Berl), 2003. **81**(7): p. 420-7.
128. Hollenberg NK. *Aldosterone in the development and progression of renal injury*. Kidney international, 2004. **66**(1): p. 1-9.
129. Kiyomoto H, Rafiq K, Mostofa M, Nishiyama A. *Possible underlying mechanisms responsible for aldosterone and mineralocorticoid receptor-dependent renal injury*. Journal of pharmacological sciences, 2008. **108**(4): p. 399-405.
130. Adel H, Taye A, Khalifa MM. *Spironolactone improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2014. **387**(12): p. 1187-1197.
131. Zhang L, Hao J-B, Ren L-S, Ding J-L, Hao L-R. *The aldosterone receptor antagonist spironolactone prevents peritoneal inflammation and fibrosis*. Laboratory Investigation, 2014. **94**(8): p. 839-850.
132. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, Reyna J, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA. *Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury*. Kidney International, 2012. **83**: p. 93-103.
133. Metcalfe PD, Leslie JA, Campbell MT, Meldrum DR, Hile KL, Meldrum KK. *Testosterone exacerbates obstructive renal injury by stimulating TNF- $\alpha$  production and increasing proapoptotic and profibrotic signaling*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2008. **294**(2): p. E435-E443.

134. Koch DC, Jang HS, O'Donnell EF, Punj S, Kopparapu PR, Bisson WH, Kerkvliet NI, Kolluri SK. *Anti-androgen flutamide suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation via the aryl hydrocarbon receptor mediated induction of transforming growth factor-beta1*. *Oncogene*, 2015. **34**(50): p. 6092-104.
135. Carvajal C, Herrada A, Castillo C, Contreras F, Stehr C, Mosso L, Kalergis A, Fardella C. *Primary aldosteronism can alter peripheral levels of transforming growth factor  $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$* . *Journal of endocrinological investigation*, 2009. **32**(9): p. 759-765.
136. Kakoki M, Pochynyuk OM, Hathaway CM, Tomita H, Hagaman JR, Kim HS, Zaika OL, Mamenko M, Kayashima Y, Matsuki K, Hiller S, Li F, Xu L, Grant R, Bertorello AM, Smithies O. *Primary aldosteronism and impaired natriuresis in mice underexpressing TGFbeta1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(14): p. 5600-5.
137. Matsuki K, Hathaway CK, Chang AS, Smithies O, Kakoki M. *Transforming growth factor beta1 and aldosterone*. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 2015. **24**(2): p. 139-144.
138. Hinojosa-Laborde C, Lange DL, Haywood JR. *Role of female sex hormones in the development and reversal of dahl hypertension*. *Hypertension*, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 484-9.
139. Xue B, Johnson AK, Hay M. *Sex differences in angiotensin II- and aldosterone-induced hypertension: the central protective effects of estrogen*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013. **305**(5): p. R459-63.
140. Tofovic SP, Salah EM, Dubey RK, Melhem MF, Jackson EK. *Estradiol metabolites attenuate renal and cardiovascular injury induced by chronic nitric oxide synthase inhibition*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005. **46**(1): p. 25-35.
141. Prabhushankar R, Krueger C, Manrique C. *Membrane estrogen receptors: their role in blood pressure regulation and cardiovascular disease*. *Curr Hypertens Rep*, 2014. **16**(1): p. 408.
142. Cogswell ME, Mugavero K, Bowman BA, Frieden TR. *Dietary Sodium and Cardiovascular Disease Risk - Measurement Matters*. *N Engl J Med*, 2016.
143. Hill AB. *The environment and disease: association or causation?* *Proceedings of the Royal society of Medicine*, 1965. **58**(5): p. 295.
144. Rakova N, Jüttner K, Dahlmann A, Schröder A, Linz P, Kopp C, Rauh M, Goller U, Beck L, Agureev A. *Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na<sup>+</sup> balance*. *Cell metabolism*, 2013. **17**(1): p. 125-131.
145. Vogel C, Marcotte EM. *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(4): p. 227-32.
146. Pascual-Le Tallec L, Lombes M. *The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(9): p. 2211-21.

## 7 Anhang

### 7.1 Eidesstaatliche Erklärung

„Ich, Meghna Jha, versichere an Eidesstatt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Androgenen und Salzhaushalt auf die renale Mineralokortikoid- und Glukokortikoidrezeptor-Expression von orchiektomierten Wistar-Ratten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **7.2 Lebenslauf**

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

## 7.3 Publikationen

### Anteilserklärung an Publikationen

Meghna Jha hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1 (Posterpräsentation):

**Meghna Jha**, Peter Josef Hofmann, Marten Michaelis, Franziska Götz, Marcus Quinkler und Tina Kienitz. Flutamide regulates renal GR and MR expression in orchietomized rats depending on salt status. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting and Expo, 2013

Beitrag im Einzelnen:

Datenerhebung, Auswertung der Ergebnisse, Postergestaltung

Publikation 2 (Kongressbeitrag):

**Meghna Jha**, Peter Josef Hofmann, Marten Michaelis, Franziska Götz, Marcus Quinkler und Tina Kienitz. Role of Androgens and Salt Status on renal MR and GR expression in orchietomized rats. The 19th Annual Meeting Young Active Research in Endocrinology, 2017

Beitrag im Einzelnen:

Datenerhebung, Auswertung der Ergebnisse, Gestaltung und Präsentation des Vortrages



## 7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den Personen entgegenbringen, ohne deren Unterstützung die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Quinkler, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, die gute Laune und sein stets offenes Ohr. Besonders dankbar bin ich Frau Dr. Kienitz, die mich in inhaltlichen und methodischen Fragen stets unterstützt hat. Mit ihrem Einsatz und ihrer Zuwendung hat sie mich auch über die Doktorarbeit hinaus inspiriert und mir stets vorgelebt, dass die Forschung kein Einzelkampf sein muss.

Ich danke Prof. Dr. Spranger, dem Klinikdirektor für den Bereich Endokrinologie, Diabetes und Ernährungsmedizin und seinem Vorgänger Herrn Prof. Dr. Strasburger. Dr. Peter Hofmann und Dr. Marten Michaelis danke ich für die Vorbereitung der Versuchstiere.

Zusätzlich danke ich Sabine Kaiser und Sabine Wricke, welche mich herzlich in den Laboralltag empfangen und begleitet haben. Dr. Zida Wu's Anregungen und Vorschläge bei experimentellen Herausforderungen haben mich vor einigen brenzligen Situationen bewahrt. Ebenso danke ich meinem Laborpartner Christopher Bartel für seine Freundschaft und den konstruktiven Austausch, die mein Leben stets bereichert haben. Nicht zu vergessen die Einarbeitung in die Labortätigkeit und zahlreichen praktischen Tipps. Ich danke ganz herzlich meiner Mitarbeiterin Ina Lehmpful, die mir eine gute Freundin geworden ist und durch zahlreiche Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene in Erinnerung bleiben wird.

Für die Bereitstellung von Material und Gerätschaften danke ich den Forschungslaboren der Klinik für Urologie, Klinik für Dermatologie und dem Institut für Klinische Pharmakologie. Herrn Prof. Dr. Celso Gomez-Sanchez danke ich für die Zusendung des Mineralokortikoid-Antikörpers.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, Roly und Mahesh Jha, für ihre unablässliche Geduld und stetige Ermutigung, sowie für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung, die mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin. Auch

möchte ich meinem Bruder, Mayur Jha, danken, der mich in allen Höhen und Tiefen begleitet hat.