

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

Der Epoxyeicosatriensäure-Signalweg der glatten Gefäßmuskulatur unter Aldosteronexzess – transkriptionelle und funktionelle Effekte

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Miriam Laura Brunnenkant, geb. Frühbuß

aus Ratingen

Jahr 2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Reincke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bruno C. Huber
Prof. Dr. Gerd Juchem
Prof. Dr. Andreas Schober

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Holger Scheider

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2023

Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung:	III
Abbildungsverzeichnis:	V
Abkürzungsverzeichnis:	XI
1. Einleitung	1
1.1. Primärer Hyperaldosteronismus	1
1.2. Kardiovaskuläre Probleme bei PHA-Patienten	2
1.3. Die Plastizität der glatten Muskelzelle	3
1.3.1. Verschiedene muskulären Phänotypen.....	3
1.3.2. Marker des Phänotypen-Switch	3
1.3.2.1. α -Aktin	3
1.3.2.2. Schwere Kette von Myosin	4
1.3.2.3. Osteopontin.....	4
1.3.2.4. Spannungsabhängiger Kalziumkanal: Cav1.2.....	4
1.4. Wirkung von Aldosteron	5
1.4.1. Cortisol, ein weiterer Ligand des MR.....	5
1.4.2. Genomische Wirkung von Aldosteron auf die Gefäßmuskelzelle	6
1.4.2.1. Der Angiotensin-II Rezeptor Typ 1 (AT ₁ R).....	7
1.4.2.2. Der epitheliale Natriumkanal	7
1.4.2.3. Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie	8
1.4.2.4. Der BK _{Ca} -Kanal	8
1.5. Vasorelaxierende endotheliale Faktoren	9
1.5.1. Epoxyeicosatriensäuren	9
1.5.2. Epoxyeicosatriensäuren und der primäre Hyperaldosteronismus.....	10
2. Zielsetzung	12
3. Methoden und Material	13
3.1. Methoden	13
3.1.1. Zellkultur.....	13
3.1.1.1. Behandlung der Zellen für die qPCR.....	14
3.1.1.2. Behandlung der Zellen für den Western-Blot.....	15
3.1.1.3. Behandlung der Zellen für die Kalzium-Bildgebung	15
3.1.2. Molekularbiologische Verfahren	15
3.1.2.1. qPCR	15
3.1.2.2. Western-Blot	20
3.1.2.3. Kalzium-Bildgebung	22
3.2. Material	25
3.2.1. Zellen	25
3.2.2. Zellkultur.....	25
3.2.3. RNA-Extraktion	26
3.2.4. Reverse Transkriptase	26
3.2.5. qPCR	26
3.2.6. Proteinbehandlung und Western-Blot	27
3.2.7. Kalzium-Bildgebung.....	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Bestimmung der Referenzgene für die RT-qPCR	29
4.2. RT-qPCR Ergebnisse	30
4.2.1. Gliederung der Ergebnisdarstellung.....	30
4.2.2. Übersicht	31
4.2.2.1. Marker des Phänotypen-Switch	33

4.2.2.1.1.	Glattmuskuläres α -Aktin Typ 2 - ACTA2	33
4.2.2.1.2.	Glattmuskuläre schwere Kette von Myosin - MYH11.....	36
4.2.2.1.3.	Der Proliferationsmarker - MKI67	40
4.2.2.1.4.	Osteopontin - SPP1.....	43
4.2.2.1.5.	Expression der α -Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals - CACNA1C.....	46
4.2.2.2.	Strukturen für transkriptionelle Marker der MR-vermittelten Signaltransduktion	47
4.2.2.2.1.	Die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 1 und 2 - HSD11B1 und HSD11B2	47
4.2.2.2.2.	Der epitheliale Natriumkanal – SCNN1A	49
4.2.2.2.3.	Der Mineralokortikoidrezeptor - NR3C2	54
4.2.2.2.4.	Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 - AGTR1	56
4.2.2.3.	EET-Signalkaskade	57
4.2.2.3.1.	Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie - TRPV4	57
4.2.2.3.2.	Die porenbildende Untereinheit des BKCa-Kanals - KCNMA1.....	59
4.2.2.3.3.	Die Epoxidhydrolasen: EPHX1 und EPHX2.....	65
4.3.	Western-Blot	69
4.4.	Kalzium-Bildgebung	70
5.	Diskussion	72
5.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
5.2.	Diskussion von Material und Methoden	72
5.3.	Diskussion der Ergebnisse	74
5.3.1.	Diskussion der RT-qPCR Ergebnisse.....	74
5.3.1.1.	Diskussion der Ergebnisse zu den Markern des Phänotypen-Switch	74
5.3.1.1.1.	α -Aktin: ACTA2	74
5.3.1.1.2.	Myosin schwere Kette - MYH11	75
5.3.1.1.3.	Proliferationsmarker – MKI67	76
5.3.1.1.4.	Osteopontin - SPP1.....	78
5.3.1.1.5.	α -1C Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals - CACNA1C.....	79
5.3.1.2.	Diskussion der Ergebnisse zu den Strukturen für transkriptionelle Marker der MR-vermittelten Signaltransduktion	80
5.3.1.2.1.	HSD11B1 und HSD11B2	80
5.3.1.2.2.	α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals - SCNNA1.....	81
5.3.1.2.3.	Mineralokortikoidrezeptor - NR3C2	82
5.3.1.2.4.	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 - AGTR1	82
5.3.1.3.	Diskussion der Ergebnisse zu der EET-Signalkaskade.....	83
5.3.1.3.1.	Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie -TRPV4	83
5.3.1.3.2.	Die porenbildende Untereinheit des BK _{Ca} -Kanals - KCNMA1	84
5.3.1.3.3.	Epoxidhydrolasen – mEH und sEH.....	85
5.3.2.	Diskussion der Ergebnisse des Western-Blots.....	86
5.3.3.	Diskussion der Kalzium-Bildgebung.....	87
6.	Literaturverzeichnis	90
7.	Anhang	102
8.	Danksagung	103
9.	Affidavit	104
10.	Publikationsliste	105

Zusammenfassung:

Das Krankheitsbild des primären Hyperaldosteronismus (PHA) ist die häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie. Der erhöhte Aldosteronspiegel kann in den meisten Fällen auf eine uni- oder eine bilaterale Hypersekretion der Nebennieren zurückgeführt werden. Ist eine Nebenniere betroffen, wird die unilaterale Adrenalektomie empfohlen. Bei 67 Prozent der PHA-Patienten kommt es nach Adrenalektomie zu keiner Heilung des Bluthochdrucks, obwohl sich der Aldosteronspiegel in 94 Prozent der Fälle normalisiert. Ein Grund für die Divergenz von normalisierten Aldosteronspiegeln und Blutdruckansprechen könnte das arterielle Remodeling mit dem damit verbundenen glattmuskulären Phänotypen-Switch sein. Dieser kann durch verminderte Freisetzung oder Wirkung von endothelialen vasoaktiven Faktoren wie Stickstoffmonoxid (NO) verursacht werden. Neben dem endothelvermittelten Relaxationsfaktor (NO) existieren endothelvermittelte hyperpolarisierende Faktoren (EDHF), welche u.a. die Epoxyeicosatriensäuren (EETs) umfassen. Bei PHA-Patienten gibt es bisher keine Untersuchungen zu einer potenziellen Beeinträchtigung der EET-Signalkaskade durch Aldosteron. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich Aldosteron auf den Phänotyp der glatten Muskelzellen auswirkt und ob es unter Aldosteron-Exzess zu Veränderungen der EET-Signalkaskade kommt.

Primäre humane glatte Muskelzellen aus Koronararterien (VSMC) wurden für 24 und 48 h mit unterschiedlichen Aldosteronkonzentrationen behandelt. Ergänzend wurde die in vivo stattfindende duale Stimulation des Mineralokortikoidrezeptors (MR) durch Kostimulation mit Hydrocortison und Aldosteron nachgestellt. Expressionsänderungen von Genen im Bereich des Phänotypen-Switch, der mineralokortikoidvermittelten Signaltransduktion und der EET-Signalkaskade wurden mittels quantitativer real time PCR (RT-qPCR) und Western-Blot untersucht. Funktionelle Effekte wurden mittels Kalziumimaging (Fura-2) erfasst, wobei die Antwort der VSMC auf das EET-Regioisomer 14,15-EET untersucht wurde.

Ein aldosteroninduzierter Phänotypen-Switch konnte durch die Expressionsanalyse von den bei einem Phänotypen-Switch bekanntermaßen negativ (ACTA2, MYH11) und positiv regulierten Genen (SPP1, MKI67) nicht nachgewiesen werden. In der RT-qPCR zeigte sich bei der Untersuchung der Gene zu der EET-Signalkaskade eine starke Expressionsreduktion der α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals unter der Hydrocortison-Behandlung. Dieser Effekt verstärkte sich geringgradig bei zusätzlicher Behandlung mit Aldosteron. Diese zusätzliche Reduktion durch Aldosteron konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Der BK_{Ca}-Kanal wird indirekt durch EETs aktiviert und führt infolgedessen zu einer Hyperpolarisation, welche zu einem reduzierten Kalziumeinstrom durch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle führt.

Zudem zeigte sich eine vor allem durch Hydrocortison bedingte Expressionsreduktion des Mineralokortikoidrezeptors (NR3C2). Die Expressionslevel der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenasen (11 β -HSD-1 und 11 β -HSD2), deren Aktivitätsverhältnis die Transaktivierung des MR durch Glukokortikoide kontrolliert, wurden durch Aldosteron nicht verändert. Es konnte darüber hinaus keine funktionelle Auswirkung von Aldosteronexzess auf die EET-vermittelte Kalziumantwort der VSMC und die Spontanaktivität festgestellt werden.

Insgesamt hatte Aldosteron sehr wenige Effekte auf Genexpression und Funktion der VSMC, sowohl im Hinblick auf Phänotypen-Switch als auch auf die EET-Signaltransduktion. Die demonstrierte Reduktion der MR-Expression bereits durch die Hydrocortison-Kontrollbehandlung

könnte hierfür als mögliche Erklärung dienen. Positiv ausgedrückt scheint ein Aldosteronexzess, der vergleichbar mit in vivo Konzentrationen ist, die Elemente der EET-Signalkaskade in VSMC funktionell intakt zu lassen. Ein vermehrtes VSMC-Ansprechen durch Verwendung von löslichen Epoxidhydrolasehemmern ist also auf Basis der gezeigten Befunde sehr wahrscheinlich und könnte zur Blutdrucksenkung bei Patienten mit PHA eingesetzt werden.

Als neuartiger Befund konnte eine starke Reduktion der BK_{Ca}-Expression durch Hydrocortison gezeigt werden, welche zu einer glukokortikoidinduzierten Hypertonie beitragen könnte. Weiterführende Untersuchungen zu dem BK_{Ca}-Kanal an Mausmodellen oder an Patientengeweben könnten neue Behandlungskonzepte bei Cushing-Syndrom oder Patienten mit Aldosteron- und Cortisol-kosezernierenden Adenomen liefern.

Abbildungsverzeichnis:

ABBILDUNG 1: FOREST-LOT DER OR VON KV-ERKRANKUNGEN BEI PATIENTEN MIT PHA UND EH. GELB MARKIERT IST DIE OR VON SCHLAGANFÄLLEN, OR: 2,58 (95% CI: 1,93-3,45). ORANGE IST DIE OR VON PAVK, OR: 1,77 (95% CI: 1,1-2,83). BLAU DARGESTELLT IST DIE OR VON VORHOFFLIMMERN, OR: 3,52 (95% CI: 2,06-5,99). GRÜN IST DIE OR VON HERZINSUFFIZIENZ DARGESTELLT, OR: 2,05 (95% CI: 1,1-3,78). EINE OR VON 1 BEDEUTET, DASS ES ZWISCHEN EH- UND PHA-PATIENTEN KEINEN UNTERSCHIED IN DER OR GIBT. ES WURDEN JEWEILS 5 - 8 STUDIEN PRO KV-ERKRANKUNG UNTERSUCHT. DIESE DARSTELLUNG FASST DIE ERGEBNISSE DER IM JAHRE 2018 VERÖFFENTLICHTEN META-ANALYSE VON MONTICONE ET AL ZUSAMMEN(9). OR = ODDS RATIO; KV = KARDIO-VASKULÄRE; PHA = PRIMÄRER HYPERALDOSTERONISMUS; EH = ESSENZIELLE HYPERTONIE; CI = KONFIDENZINTERVALLE, PAVK = PERIPHERE ARTERIELLE VERSCHLUSSKRANKHEIT..... 2

ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG BEKANNTER UND HYPOTHETISCHER TRANSKRIPTIONELLER WIRKUNGEN VON ALDOSTERON IN DER GEFÄßMUSKELZELLE. ALDOSTERON DIFFUNDIERT AUFGRUND SEINES LIPHILEN CHARAKTERS DURCH DIE ZELLMEMBRAN UND KANN DEN ZYTOSOLSTÄNDIGEN MR BINDEN. AUCH CORTISOL KANN IN DIE ZELLE DIFFUNDIEREN UND THEORETISCH DEN MR BINDEN, WIRD DORT ABER TEILWEISE DURCH 11-BHSD TYP 2 IN DAS INAKTIVE CORTISON UMGEWANDELT. DER ALDOSTERON-REZEPTORKOMPLEX WANDERT IN DEN ZELLKERN UND WIRKT ÜBER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN AUF DIE GENTRANSKRIPTION. IN VSMC IST EINE ALDOSTERONINDUZIERTER AKTIVIERUNG DES ANGIOTENSIN-II REZEPTOR TYP 1 BEKANNT (AT1R, GEN: AGTR1). AT1R AKTIVIERT ZWAR DEN MR, ABER ZU DER FRAGE, OB EINE RÜCKKOPPLUNG AUF DIE AGTR1-EXPRESSION BESTEHT, GIBT ES BISHER KEINE UNTERSUCHUNGEN. DIE TRANSKRIPTION DES L-TYP-KALZIUMKANALS WIRD MR-ABHÄNGIG BEEINFLUSST. HIER GIBT ES WIDERSPRÜCHLICHE ERGEBNISSE (SIEHE: 1.3.2.4. SPANNUNGSABHÄNGIGER KALZIUMKANAL: CAV1.2). ZU DEM EPITHELIALEN NATRIUMKANAL UND DEM TRPV4 GIBT ES SPEZIELL IN VSMC KEINE UNTERSUCHUNGEN. DIE EXPRESSION VOM BKCA WIRD IN VSMCs IN ABHÄNGIGKEIT VON ALDOSTERON HERUNTERREGULIERT. 11-BHSD2 = 11-B-DEOXYSTEROID-DEHYDROGENASE, MR = MINERALOKORTIKOIDREZEPTOR, ENAC = EPITHELIALER NATRIUMKANAL, AGTR1 = ANGIOTENSIN-II-REZEPTOR TYP 1, CAV1.2= L-TYP KALZIUMKANAL, BKCA = "BIG CONDUCTANCE" KALZIUMAKTIVIERTER KALIUMKANAL, TRPV4 = „TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL“ (TRP)-KANAL 4 DER VANILLOIDREZEPTOR-ÄHNLICHEN SUBFAMILIE. 7

ABBILDUNG 3: WIRKUNG VON EETs AUF DIE VSMC: EETs WERDEN IN DEN ENDOTHELZELLEN ÜBER CYTOCHROM P450 AUS ARACHIDONSÄURE GEBILDET. AUSLÖSENDE FAKTOR KÖNNEN Z. B. DAS PEPTIDHORMON BRADYKININ, DER NEUROTRANSMITTER ACETYLCHOLIN ODER WANDSCHUBSPANNUNG (SHEAR STRESS) DURCH DEN BLUTSTROM SEIN. DURCH DIE EPOXIDHYDROLASEN WERDEN EETs IN DHETs UMGEWANDELT. EETs KÖNNEN DEN NICHTSELEKTIVEN KATIONENKANAL TRPV4 IN VSMC AKTIVIEREN, WELCHER DURCH SEINEN KALZIUMEINSTROM FÜR RYR-AKTIVIERENDE KALZIUM SPARKLETS SORGT. DIESE WIEDERUM AKTIVIEREN DEN BKCA -KANAL. DADURCH KOMMT ES ZU EINER HYPERPOLARISATION DER ZELLE UND EINER REDUKTION DES (SONST BESTÄNDIG STATTFINDENDEN) KALZIUMEINSTROMS DURCH SPANNUNGSABHÄNGIGE KALZIUMKANÄLE. DIESE SPANNUNGSABHÄNGIGEN KANÄLE WERDEN AUCH DURCH DIE ÜBERTRAGUNG VON HYPERPOLARISIERENDEN STRÖMEN ÜBER GAP JUNCTIONS GEHEMMT. AUF EINEM DRITTEN WEG INHIBIEREN EETs DIE PHOSPHOLIPASE C, WODURCH DIE GLATTE MUSKELZELLE RELAXIERT. AA = ARACHIDONSÄURE, BK_{Ca} = KALZIUMGESTEUERTER KALIUMKANAL MIT GROßER LEITFÄHIGKEIT, CA²⁺ = KALZIUM, CYP 450 = CYTOCHROM P450, DHET = DIHYDROEICOSATRIENONSÄURE; EET = EPOXYEICOSATRIENSÄUREN, GJ = GAP JUNCTION; RYR= RYANODIN REZEPTOR, TRPV4 = TRP- KANAL 4 DER VANILLOIDREZEPTOR-ÄHNLICHEN SUBFAMILIE. (ABBILDUNG NACH (85, 93, 94)). 10

ABBILDUNG 4: ACTA2-EXPRESSION UNTER 10 NM UND 100 NM ALDOSTERON NACH 24 H (A) NACH 48 H (B) UND EINEN VERGLEICH BEIDER ZEITEN (C). EINE SERUM STARVATION (S.s.) FAND NUR BEI DER 48-STÜNDIGEN BEHANDLUNG STATT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: EIF2B1 UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZUM MITTELWERT DER JEWEILIGEN KONTROLLBEHANDLUNG (CTR. = DMSO) UND ZUM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 24 H (CTR. = DMSO) BEI Abb. C. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDEN INNERHALB DER DARSTELLUNG DER EINZELNEN BEHANDLUNGSZEITEN (A,B). ES ZEIGTEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN 24-STÜNDIGEN BEHANDLUNGEN UND DER VERDOPPLUNG DER BEHANDLUNGSZEIT UNTER A 100 UND A 10 (* = p < 0,05) (C). SIGNIFIKANZ GETESTET MIT ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 100 = ALDOSTERON (100 NM); A 10 = ALDOSTERON (10 NM); Ep = EPLERENON (2 µM); H = STUNDEN. N = 3. 33

ABBILDUNG 5: ACTA2-EXPRESSION UNTER 1 NM ALDOSTERON NACH 24- UND 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER 24-STÜNDIGEN KONTROLLBEHANDLUNG (24H DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDEN ZWISCHEN DEN UNTERSCHIEDLICHEN BEHANDLUNGSZEITEN. DIE EXPRESSIONEN WAREN NACH 48 H SIGNIFIKANT ERHÖHT INNERHALB DER DMSO-BEHANDLUNG (24 H VS 48 H, * = p < 0,05), DER ALDOSTERONBEHANDLUNG (24 H

- vs 48 h, # = $p < 0,05$), SOWIE DER BEHANDLUNG MIT ALDOSTERON UND HYDROCORTISON (24 h vs 48 h, § = $p < 0,05$) UND JENER MIT PDGF (24 h vs 48 h, ++ = $p < 0,01$). SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA GEFOLGT VON DEM POST-HOC TEST NACH SIDAK. A 1 = ALDOSTERON 1 nM; EP = EPLERENON 2 μ M; F = HYDROCORTISON 140 nM; PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml); H = STUNDEN. N = 3..... 34
- ABBILDUNG 6: MYH11-EXPRESSION NACH 24- UND 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H MIT DMSO UND F. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN BEHANDLUNGEN. GETESTET INNERHALB DER BEHANDLUNGEN (24 h vs. 48 h) MITTELS ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC-TEST NACH SIDAK. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); PDGF-BB = PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml); H = STUNDEN. N = 3 36
- ABBILDUNG 7: MYH11-EXPRESSION NACH 48 H MIT UND OHNE HYDROCORTISON. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H MIT DMSO UND F. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDEN. N = 3 UND N = 6. 37
- ABBILDUNG 8: EINFLUSS VON GR UND MR AUF DIE MYH11-EXPRESSION. GEZEIGT SIND VERSCHIEDENE BEHANDLUNGSKOMBINATIONEN MIT DEN REZEPTOR-ANTAGONISTEN EP UND RU486 SOWIE DEN STIMULANTIEN F UND A. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); RU486 = MIFEPRISTON (1 μ M); H = STUNDEN. N = 3 UND N = 6. 38
- ABBILDUNG 9: MYH11-EXPRESSION UNTER 14,15-EET BEI EINER BEHANDLUNGSDAUER VON 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO + F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); EET = 14(15)-EET (1 μ M); EEZE = 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M); H = STUNDEN. N = 3 UND N = 6. 39
- ABBILDUNG 10: GEGENÜBERSTELLUNG DER EXPRESSION VON MKI67 NACH 24 H BEHANDLUNG, OHNE VORANGEGANGENE SERUM STARVATION. DIE ERGEBNISSE SIND JEWEILS NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: EIF2B1 UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER JEWEILIGEN KONTROLLBEHANDLUNG. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA. A 100 = ALDOSTERON (100 nM); A 10 = ALDOSTERON (10 nM); EP = EPLERENON (2 μ M), H = STUNDEN. N = 3. 40
- ABBILDUNG 11: MKI67-EXPRESSION, DARGESTELLT IN EINER KONZENTRATIONSWIRKUNGSKURVE MIT 1 nM, 10 nM UND 100 nM ALDOSTERON IM VERGLEICH ZU DER JEWEILIGEN KONTROLLBEHANDLUNG MIT DMSO (ÄQUIVALENTE DMSO-VOLUMENKONZENTRATION ZUR JEWEILIGEN ALDOSTERONKONZENTRATION). DIE BEHANDLUNG ERFOLGTE JEWEILS FÜR 48 H. ES KONNTEN KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE FESTGESTELLT WERDEN. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY-ANOVA. N = 3. 41
- ABBILDUNG 12: MKI67-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 24 UND 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: PPIA UND GAPDH UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO + F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. DIE EXPRESSION VON MKI67 WAR UNTER PDGF-BB NACH 24 H SIGNIFIKANT GEGENÜBER ALLEN ANDEREN BEHANDLUNGEN ERHÖHT. *** = $p < 0,001$. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA, GEFOLGT VON DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); PDGF-BB = PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml); H = STUNDEN. N=3. 42
- ABBILDUNG 13: SPP1- EXPRESSION UNTER 10 nM UND 100 nM ALDOSTERON NACH 24 H (A) NACH 48 H (B). EINE SERUM STARVATION FAND NUR BEI DER 48-STÜNDIGEN BEHANDLUNG STATT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: EIF2B1 UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZUM MITTELWERT DER JEWEILIGEN KONTROLLBEHANDLUNG (CTR. = DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM)

DARGESTELLT. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A 100 = ALDOSTERON (100 nM); A 10 = ALDOSTERON (10 nM); EP = EPLERENON (2 µM); H = STUNDEN. N = 3.	43
ABBILDUNG 14: SPP1-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 24 UND 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: PPIA UND GAPDH UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO + F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN BEHANDLUNGEN. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 µM); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDE; PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml); H = STUNDEN. N = 3.	44
ABBILDUNG 15: SPP1-EXPRESSION UNTER 14,15-EET NACH 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO MIT F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. IM T-TEST WAR DIE EXPRESSION UNTER F + A1 + EET + EEZE GEGENÜBER DER DMSO + F-BEHANDLUNG SIGNIFIKANT ERHÖHT. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 µM); F = HYDROCORTISON (140 nM); EET, 14,15-EET (1 µM); EEZE = 14,15-EE-5(Z)-E (10 µM), H = STUNDEN. N = 6 UND N = 3.	45
ABBILDUNG 16: CACNA1C-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 48-STÜNDIGER BEHANDLUNG. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO UND F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A1 = ALDOSTERON 1nM; EP = EPLERENON 2µM; F = HYDROCORTISON 140nM; H = STUNDEN. N = 3.	46
ABBILDUNG 17: HSD11B1-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 24- UND 48-STÜNDIGER BEHANDLUNG. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO UND F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 µM); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDEN. N = 3.	47
ABBILDUNG 18: HSD11B2-EXPRESSION UNTER 1nM ALDOSTERON NACH 24- UND 48-STÜNDIGER BEHANDLUNG. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA. DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO UND F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN BEHANDLUNGEN. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 µM); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDEN. N = 3.	48
ABBILDUNG 19: SCNN1A-EXPRESSION UNTER 100 nM ALDOSTERON NACH 48 H. ALLE GRUPPEN WURDEN ZUVOR MIT EINER SERUM STARVATION BEHANDELT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: EIF2B1 UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO + F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. STATISTISCH GEPRÜFT MITTELN ONE-WAY ANOVA. A 100 = ALDOSTERON (100 nM); EP = EPLERENON (2 µM); H = STUNDEN. N = 3.	49
ABBILDUNG 20: SCNN1A-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 24- UND 48-STÜNDIGER BEHANDLUNG. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: PPIA UND GAPDH UND SIND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO +F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 µM); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDE; PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml); H = STUNDEN. N = 3, N = 6.	50
ABBILDUNG 21: SCNN1A-EXPRESSION NACH 48 H MIT VERDOPPELTER ANZAHL DER EXPERIMENTE ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO UND F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT ± STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES LIEßEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE REGISTRIEREN. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM) EP = EPLERENON (2 µM); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDEN. N = 6.	51

- ABBILDUNG 22: EINFLUSS VON GR UND MR AUF DIE SCNN1A-EXPRESSION. GEZEIGT SIND VERSCHIEDENE BEHANDLUNGSKOMBINATIONEN MIT DEN REZEPTOR-ANTAGONISTEN EP UND RU486 SOWIE SIMULTANER GLUKO- ODER MINERALOKORTIKOIDAPPLIKATION. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES LIEßEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE REGISTRIEREN. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDEN; RU486 = MIFEPRISTON (1 μ M). n = 3 UND n = 6. 52
- ABBILDUNG 23: SCNN1A-EXPRESSION UNTER 14,15-EET ZUR BEWERTUNG DES MR-SIGNALWEGS NACH EINER BEHANDLUNGSDAUER VON 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO MIT F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES LIEßEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE REGISTRIEREN. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); EET = 14(15)-EET (1 μ M); EET-5(Z)-E, 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDEN. n = 3. 53
- ABBILDUNG 24: NR3C2 UNTER 100 nM ALDOSTERON NACH 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: EIF2B1 UND PPIA DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES LIEßEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE REGISTRIEREN. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA, GEFOLGT VON DEM POST-HOC TEST NACH DUNNETT. A 100 = ALDOSTERON (100 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); H = STUNDEN. n = 3. 54
- ABBILDUNG 25: NR3C2-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 24- UND 48-STÜNDIGER BEHANDLUNG. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: PPIA UND GAPDH UND SIND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO + F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN 48-STÜNDIGEN EXPRESSIONEN MIT DMSO ZU DER 24-STÜNDIGEN DMSO-BEHANDLUNG, DER 48-STÜNDIGEN A-BEHANDLUNG, DER BEHANDLUNG MIT DMSO + F UND ZWISCHEN DER 48-STÜNDIGEN A-BEHANDLUNG ZU DER 48-STÜNDIGEN A + F-BEHANDLUNG. *** = p < 0,001, ** = p < 0,01 UND # = p < 0,01; SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MIT ONE-WAY ANOVA, GEFOLGT VOM POST-HOC TEST NACH SIDAK. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml), H = STUNDEN. n = 3. 55
- ABBILDUNG 26: AGTR1-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO UND F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. DIE 48-STÜNDIGE F + A-BEHANDLUNG ZEIGTE GEGENÜBER DER KONTROLLGRUPPE EINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED. * = p < 0,05 vs. DMSO + F. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELN ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); H = STUNDEN. n = 3. 56
- ABBILDUNG 27: TRPV4-EXPRESSION UNTER 100 nM ALDOSTERON NACH 24 H (A) UND 48 H (B). DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: EIF2B1 UND GAPDH UND SIND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. BEI (A) UND (B) ZEIGTEN SICH KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE INNERHALB DER JEWEILIGEN BEHANDLUNGSZEIT. SIGNIFIKANZ GEPRÜFT MITTELN ONE-WAY ANOVA. A 100 = ALDOSTERON (100 nM); A 10 = ALDOSTERON (10 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); H = STUNDEN. n = 3. 57
- ABBILDUNG 28: TRPV4-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 24 UND 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE GRUPPEN SIND NORMIERT AUF DIE HAUSHALTSGENE GAPDH UND PPIA UND SIND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO+F NACH 48 H). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. SIGNIFIKANZ GETESTET MIT ONE-WAY ANOVA, GEFOLGT VON DEM POST-HOC TEST NACH SIDAK. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml); H = STUNDEN. n = 3. 58
- ABBILDUNG 29: KCNMA1-EXPRESSION NACH 48 H UNTER 10 nM UND 100 nM ALDOSTERON. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHFÜHRT. DIE DARGESTELLTEN ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: EIF2B1 UND PPIA. ALLE ERGEBNISSE SIND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION

- ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DER BEHANDLUNG MIT 10 NM A UND 10 NM A + EP (* = $p < 0,05$). SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA, GEFOLGT VON DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 10 = ALDOSTERON (10 NM); A 100 = ALDOSTERON (100 NM); EP = EPLERENON (2 μ M); H = STUNDEN. N = 3. 59
- ABBILDUNG 30: KCNMA1-EXPRESSION UNTER 1 NM ALDOSTERON NACH 24 UND 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: PPIA UND GAPDH UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG NACH 48 H (DMSO +F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. BEI EINEM VERGLEICH DER UNTERSCHIEDLICHEN ZEITEN DIE EXPRESSION DER 24-STÜNDIGEN DMSO-BEHANDLUNG GEGENÜBER DER 48-STÜNDIGEN DMSO-BEHANDLUNG SIGNIFIKANT ERHÖHT. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 1 = ALDOSTERON (1 NM); EP = EPLERENON (2 μ M); PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 NG/ML), H = STUNDEN. N = 3. 60
- ABBILDUNG 31: KCNMA1-EXPRESSION UNTER 1 NM ALDOSTERON NACH 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. ALLE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: PPIA UND GAPDH UND DARGESTELLT RELATIV ZUM EXPRESSIONSNIVEAU DERSELBEN BEHANDLUNG NACH 24 H. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DER DMSO-BEHANDLUNG UND DER ALDO-BEHANDLUNG (* = $p < 0,05$) UND ZWISCHEN DER DMSO-BEHANDLUNG UND DER BEHANDLUNG MIT DMSO UND F (**** = $p < 0,0001$). IM VERGLEICH ZU DER BEHANDLUNG MIT ALDOSTERON WAR DIE EXPRESSION NACH MIT F + A SIGNIFIKANT ERNIEDRIGT (§§ = $p < 0,01$). SIGNIFIKANZ SELEKTIV GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH SIDAK (OHNE DIE GRUPPEN F+ALDO+EP UND PDGF). NS = NICHT SIGNIFIKANT; A 1 = ALDOSTERON (1 NM); EP = EPLERENON (2 μ M); PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 NG/ML); H = STUNDEN. N = 3. 61
- ABBILDUNG 32: KCNMA1-EXPRESSION NACH 48 H- ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO MIT F). ES KONNTE EIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED ZWISCHEN DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO + F) UND DER A + F-BEHANDLUNG FESTGESTELLT WERDEN). * $p < 0,05$ vs. DMSO +F. SIGNIFIKANZ GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA, GEFOLGT VON DEM POST-HOC TEST NACH DUNNETT. A 1 = ALDOSTERON (1 NM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 NM), H = STUNDEN. N = 6. 62
- ABBILDUNG 33: EINFLUSS VON GR UND MR AUF DIE KCNMA1-EXPRESSION. GEZEIGT SIND VERSCHIEDENE BEHANDLUNGSKOMBINATIONEN MIT DEN REZEPTOR-ANTAGONISTEN EP UND RU SOWIE DEN AGONISTEN F UND A. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ZEIGTEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE. DIE STERNE MARKIEREN DIE UNTERSCHIEDE ZU DER KONTROLLGRUPPE DMSO (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$), DIE § ZU A (§§ = $p < 0,01$) UND DIE § ZU A + F (§§ = $p < 0,01$). SIGNIFIKANZ GETESTET MIT ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 1 = ALDOSTERON (1 NM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 NM); RU486 = MIFEPRISTON (1 μ M); H = STUNDEN. N = 3, N = 6. 63
- ABBILDUNG 34: KCNMA1-EXPRESSION UNTER 14,15-EET NACH 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO +F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. SIGNIFIKANTE EXPRESSIONUNTERSCHIEDE ZU DER KONTROLLGRUPPE SIND MIT STERNEN MARKIERT: * = $p < 0,05$ vs. DMSO + F. SIGNIFIKANZ GETESTET MIT ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH SIDAK. A 1 = ALDOSTERON (1 NM); F = HYDROCORTISON (140 NM); EET = 14(15)-EET; EET-5(Z)-E (1 μ M), 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M); GSK = GSK2256294 (3,3 NM). H = STUNDEN. N = 3, N = 6. 64
- ABBILDUNG 35: EPHX1-EXPRESSION UNTER 1 NM ALDOSTERON NACH 24 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DER DMSO-BEHANDLUNG UND DER PDGF-BEHANDLUNG (** $p < 0,01$), SOWIE ALLEN WEITEREN GEZEIGTEN BEHANDLUNGEN VS. DER PDGF-BEHANDLUNG (** = $p < 0,01$), SOWIE ALLEN WEITEREN GEZEIGTEN BEHANDLUNGEN VS. DER PDGF-BEHANDLUNG (** = $p < 0,01$). GETESTET MIT DEM ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 1 = ALDOSTERON (1 NM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 NM); PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 NG/ML); H = STUNDEN. N = 3. 65

- ABBILDUNG 36: EPHX1-EXPRESSION UNTER 1 nM ALDOSTERON NACH 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DER F + A + EP-BEHANDLUNG UND DER PDGF-BEHANDLUNG (* $p < 0,05$). GETESTET MIT DEM ONE-WAY-ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); PDGF = PDGF-BB, PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR-BB (10 ng/ml); h = STUNDEN. n = 3. 66
- ABBILDUNG 37: EPHX2-EXPRESSION NACH 24 UND 48 H. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DEM MITTELWERT DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO + F). ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. DIE EXPRESSION UNTER PDGF WAR NACH 48H SIGNIFIKANT GEGENÜBER DER 24-STÜNDIGEN PDGF-BEHANDLUNG ERHÖHT. GETESTET MIT DEM ONE-WAY-ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); h = STUNDEN. n = 3. 67
- ABBILDUNG 38: EPHX2-EXPRESSION NACH 48H IM VERGLEICH ZUR 24-STÜNDIGEN BEHANDLUNG. ALLE BEHANDLUNGEN WURDEN IM ANSCHLUSS AN EINE SERUM STARVATION DURCHGEFÜHRT. DIE ERGEBNISSE SIND NORMIERT AUF DAS GEOMETRISCHE MITTEL DER HAUSHALTSGENE: GAPDH UND PPIA UND DARGESTELLT IN RELATIVER EXPRESSION ZU DER JEWEILIGEN 24-STÜNDIGEN BEHANDLUNG. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. ES ERGABEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DER BEHANDLUNGSGRUPPEN MIT A UND DEN ZWEI WEITEREN GRUPPEN (OHNE A ODER A MIT F ANTAGONISIERT) (* $p < 0,05$). GETESTET MIT DEM ONE-WAY-ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH DUNNETT. A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); h = STUNDEN. n = 3. 68
- ABBILDUNG 39: WESTERN-BLOT AUF DIE BK_{Ca}-A-UNTEREINHEIT IM VERGLEICH ZUM HAUSHALTS-PROTEIN: B-AKTIN, A: ANGEGEBEN IST DAS SIGNAL DER GRÖßENLEITER. DIE BK_{Ca} ALPHA-BANDE LÄUFT BEI CA. 100 kDA, DIE BETA-AKTIN-BANDE BEI 42 kDA. DARSTELLUNG EINES DER 3 WESTERN-BLOTS, ZWISCHEN DEN DREI VONEINANDER UNABHÄNGIGEN DURCHGÄNGEN ERGABEN SICH KEINE SICHTBAREN UNTERSCHIEDE. B: RELATIVE UNTERSCHIEDE NACH QUANTIFIZIERUNG DER BANDEN. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. GEMESSEN WURDEN DIE GRUPPEN MIT F, F + A UND F + A + EP. n=4 EXPERIMENTE PRO GRUPPE. A = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM); kDa = KILO DALTON; UE = UNTEREINHEIT. 69
- ABBILDUNG 40: BOX-PLOT DER EINZELZELL-KALZIUM-TRANSIENTEN AUF STIMULATION MIT EET. GEZEIGT WIRD DIE INTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION ZU BEGINN DER BEHANDLUNG (BL) UND JEWEILS DAS MAXIMUM DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION NACH DER ZUGABE VON 1 μ M 14,15-EET (PEAK). DIE STERNE MARKIEREN JEWEILS DEN UNTERSCHIED ZWISCHEN DEM MEDIAN DER BL UND DEM PEAK: *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$. DIE RAUTE MARKIERT DEN UNTERSCHIED DES MEDIANS DES PEAKS BEI DER A+F+EP-GRUPPE ZU DEM MEDIAN DES PEAKS DER F-GRUPPE # = $p < 0,05$. SIGNIFIKANZ GETESTET MIT ONE-WAY ANOVA UND DEM POST-HOC TEST NACH TUKEY, n (ZELLEN/ANZAHL DER EXPERIMENTE) = 17/3 (F), 18/3 (A + F), 23/3 (A + F + Ep). A 1 = ALDOSTERON (1 nM); EP = EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM)..... 70
- ABBILDUNG 41: FREQUENZ DER SPONTANEN PEAKS ZWISCHEN DEN AUSWASCHPHASEN (BL 1-BL 2) BEI DER KALZIUM-BILDGEBUNG. DARGESTELLT IST DIE FREQUENZ IN HERTZ VON BL 1 BIS BL 3, JEWEILS IN ALLEN DREI BEHANDLUNGSGRUPPEN. ALLE DATEN SIND ALS MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER DES MITTELWERTS (SEM) DARGESTELLT. DIE BEHANDLUNG ZEIGTE KEINEN STATISTISCH RELEVANTEN EINFLUSS AUF DIE SPONTANAKTIVITÄT. GETESTET MITTELS ONE-WAY ANOVA. BL = BASELINE; A = ALDOSTERON (1 nM); EP, EPLERENON (2 μ M); F = HYDROCORTISON (140 nM). n = 3. 71
- ABBILDUNG 42: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES VERSUCHS ZUR KALZIUM-BILDGEBUNG BEI DER KONTROLLBEHANDLUNG (DMSO + HC) ZUR VERANSCHAULICHUNG DER BESTIMMUNG VON BL UND PEAK. DIE PFEILE MARKIEREN DIE IN DIE AUSWERTUNG EINGEGANGENEN MESSWERTE. DIE BASELINE WURDE EINMAL UNMITTELBAR VOR DER EET-ZUGABE BESTIMMT UND NACH DEM AUSWASCHEN. BL = BASELINE, WASH = AUSWASCHEN MIT HEPES-PUFFER..... 102

Abkürzungsverzeichnis:

14,15-EET	<i>14,15-Epoxyeicosatrienoic Acid</i> , 14,15-Epoxyeicosatriensäure
14,15-EEZE	14,15-EE-5(Z)-E
11- β -HSD	11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
A	Aldosteron
ACTA2	Gen Code für das glattmuskuläre α -Aktin
AGTR1	Gen Code für Angiotensin-II Rezeptor Typ 1
BCA	Bicinchoninsäure
BK _{Ca}	<i>large ("big") conductance calcium-activated K+ channel</i>
BSA	bovines Serumalbumin
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
CACNA1C	Gen Code für die α -1C Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
Ctr.	Kontrolle
DHET	<i>dihydroxyeicosatrienoic Acid</i> , Dihydroxyeicosatriensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
EDHF	<i>endothelium-derived hyperpolarizing factor</i> , Endothel-vermittelter Hyperpolarisationsfaktor
EET	Epoxyeicosatriensäure
EH	essenzielle Hypertonie
eNaC	epithelialer Natriumkanal
Ep	Eplerenon
EPHX1	Gen Code für die die membrangebundene Epoxidhydrolase
EPHX2	Gen Code für die lösliche Epoxidhydrolase
F	Hydrocortison
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
GRE	<i>glucocorticoid response elements</i> , Bindungsstelle für Glukokortikoide auf der DNA
h	<i>hour</i> , Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSD11B1	Gen Code für Steroid-11 β -Hydroxylase B1

HSD11B2	Gen Code für Steroid-11 β -Hydroxylase B2
IP ₃	Inositoltrisphosphat
KCNMA1	Gen Code für die porenbildende Untereinheit des BK _{CA} -Kanals
LTCC	L-Typ Kalziumkanal
mEH	<i>microsomal epoxide hydrolase</i> , mikrosomale Epoxidhydrolase
miRNA	micro-RNA
MKI67	Gen Code für den Proliferationsmarker ki-67
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MYH11	Gencode für die glattmuskuläre schwere Kette von Myosin
n	Anzahl der Versuche
NR3C2	Gen Code für den Mineralokortikoidrezeptor
PDGF-BB	<i>platelet derived growth factor-BB</i> , Wachstumsfaktor aus Thrombozyten mit zwei B-Untereinheiten
PKC	Protein Kinase C
PHA	Primärer Hyperaldosteronismus
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> , Radioimmunpräzipitationsassaypuffer, ein Lysepuffer für Zellen und Gewebe
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	<i>Real-Time Reverse Transcription polymerase chain reaction</i> , Echtzeit reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RU486	Mifepriston
RyR	Ryanodin Rezeptor
SCNN1A	α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals
sEH	<i>soluble epoxid hydrolase</i> , lösliche Epoxidhydrolase
sEHI	Inhibitor der löslichen Epoxidhydrolase
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
sig.	signifikant
SmBM	<i>smooth muscle basal medium</i> , Basalmedium der glatten Muskelzellen
SmGM	<i>smooth muscle growth medium</i> , Wachstumsmedium der glatten Muskelzellen
SPP1	Osteopontin
SOCE	<i>store-operated calcium entry</i> , Kalziumeinstrom durch speichergesteuerte Kalziumkanäle
SRF	<i>Serum response factor</i> , Transkriptionsfaktor-Protein

TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i> , eine Pufferlösung
TRPV4	Gen Code für den „ <i>vanilloid</i> “ <i>transient receptor potential channel 4</i> , den TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i> , glatte Gefäßmuskelzelle

1. Einleitung

1.1. Primärer Hyperaldosteronismus

Im Jahr 1954 beschrieb der Endokrinologe Dr. Jerome W. Conn erstmalig das Krankheitsbild des primären Hyperaldosteronismus (PHA) (1). Heute ist das Krankheitsbild definiert als eine unverhältnismäßig erhöhte Aldosteronproduktion, welche Bluthochdruck, kardiovaskuläre Probleme, Salzretention, erniedrigte Reninwerte und eine erhöhte Kaliumsekretion bedingen können (2).

Der PHA ist eine Form der arteriellen Hypertonie. In Deutschland leidet jeder dritte Erwachsene zwischen 18 und 79 Jahren an Bluthochdruck (3). Man unterscheidet zwei Hauptformen der Hypertonie, einmal die primäre Hypertonie und zweitens die sekundären Hypertonie. Bei der primären Hypertonie lässt sich kein direkter pathologischer Grund des Bluthochdrucks feststellen. Im Gegensatz dazu werden als sekundäre Hypertoniker solche Patienten zusammengefasst, bei denen eine klare Ursache der Krankheit diagnostizierbar ist. Die Therapie sekundärer Hypertonie richtet sich nach der Ätiologie, dadurch kann sie spezifischer erfolgen. Bei dem PHA ist ein erhöhter Aldosteron-Spiegel die Ursache der Hypertonie. Daher ist der PHA als Unterform der sekundären Hypertonie zu bezeichnen und weist dort mit 6 % die höchste Prävalenz auf (4). Überträgt man diese Zahlen auf die deutsche Bevölkerung, sind in Deutschland etwa 1,4 Millionen Menschen vom PHA betroffen.

Beim PHA wird zwischen zwei Hauptklassen, dem einseitigen aldosteronproduzierenden Adenom und der bilateralen adrenalen Hyperplasie, unterschieden. Nach einer Studie von Monticone et al. aus dem Jahre 2017 haben 65 % der PHA Patienten eine bilaterale adrenale Hyperplasie und 27 % ein einseitiges aldosteronproduzierendes Adenom. Nur 8 % sind keine dieser zwei Formen zuzuordnen (4). Weitere Klassen des PHA sind die unilaterale Hyperplasie, der familiäre Hyperaldosteronismus Typ I bis Typ IV, sowie das aldosteronproduzierende Nebennierenrindenzinom. Bei der beidseitigen Hyperplasie erfolgt die Behandlung medikamentös mit Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten. Bei einem einseitigen Adenom kann die betroffene Nebenniere meist operativ entfernt werden (2).

Man könnte annehmen, dass die operative Therapie eines unilateralen Adenoms zu einer vollständigen Genesung führt. Dies ist leider nicht immer der Fall. Der vollständige klinische Erfolg ist definiert als Normalisierung des Bluthochdrucks ohne die Einnahme von antihypertensiven Medikamenten. In der Operations-Erfolg-Studie für Patienten mit unilateralem primärem Hyperaldosteronismus von Williams et al. aus dem Jahre 2017 kam man zu dem Ergebnis, dass nur 37 % der Patienten nach Adrenalektomie einen vollen klinischen Erfolg erfuhren (5). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Wirkung des chronisch erhöhten Aldosteronspiegels auf das kardiovaskuläre System sein.

1.2. Kardiovaskuläre Probleme bei PHA-Patienten

Statistisch gesehen ist die Wahrscheinlichkeit an kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken bei Patienten mit PHA höher als bei essenziellen Hypertonikern (EH). Dies wurde in einer Studie von Miliez et al. 2005 festgestellt: Die Untersuchung von 124 Patienten mit PHA über einen Zeitraum von 3 Jahren zeigte, dass unabhängig vom Blutdruck PHA-Patienten häufiger als EH-Patienten an kardiovaskulären Erkrankungen leiden (6). Dieser Befund konnte 2013 mit einer deutlich größeren Patientengruppe von 459 PHA-Patienten bestätigt werden (7). Zwar ist die allgemeine Sterblichkeit bei EH- und PHA-Patienten statistisch gesehen gleich, dennoch sterben Patienten mit PHA häufiger an kardiovaskulären Folgeerkrankungen als EH-Patienten. Dieses Phänomen ist mit den Spätfolgen des PHA auf das Herz-Kreislauf-System zu erklären (8).

Welche Formen von kardiovaskulären Erkrankungen bei PHA ausgeprägter vorkommen, wurde mehrfach untersucht(4, 7, 9–11) und wird in Abbildung 1 zusammengefasst.

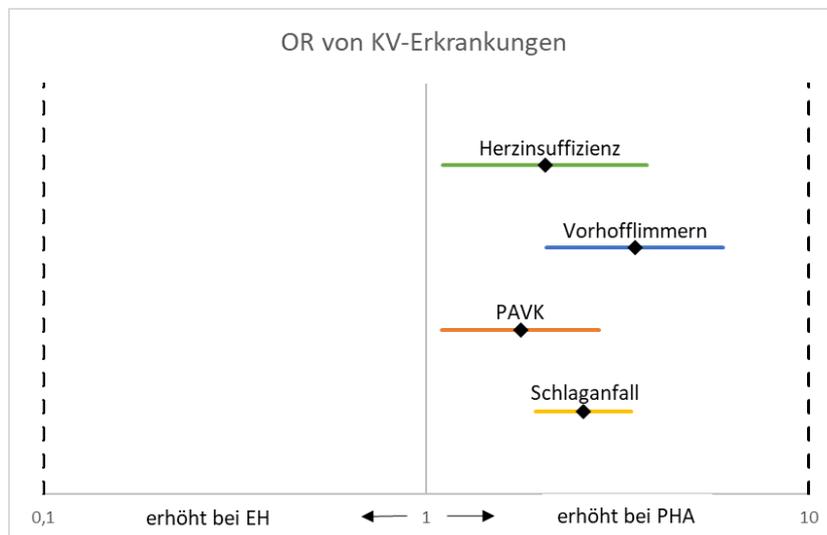


Abbildung 1: Forest-Plot der OR von KV-Erkrankungen bei Patienten mit PHA und EH. Gelb markiert ist die OR von Schlaganfällen, OR: 2,58 (95% CI: 1,93-3,45). Orange ist die OR von PAVK, OR: 1,77 (95% CI: 1,1-2,83). Blau dargestellt ist die OR von Vorhofflimmern, OR: 3,52 (95% CI: 2,06-5,99). Grün ist die OR von Herzinsuffizienz dargestellt, OR: 2,05 (95% CI: 1,1-3,78). Eine OR von 1 bedeutet, dass es zwischen EH- und PHA-Patienten keinen Unterschied in der OR gibt. Es wurden jeweils 5 - 8 Studien pro KV-Erkrankung untersucht. Diese

Darstellung fasst die Ergebnisse der im Jahre 2018 veröffentlichten Meta-Analyse von Monticone et al zusammen(9). OR = Odds Ratio; KV = kardio-vaskuläre; PHA = primärer Hyperaldosteronismus; EH = essenzielle Hypertonie; CI = Konfidenzintervalle, PAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit

Um die Prävalenz der kardiovaskulären Erkrankungen bei PHA zu reduzieren ist es sinnvoll, die physiologischen und biochemischen Prozesse von Aldosteron auf das Herz-Kreislaufsystem genauer zu verstehen. In dieser Arbeit wird die Wirkung von Aldosteron auf die glatte Gefäßmuskulzelle (VSMC) untersucht.

1.3. Die Plastizität der glatten Muskelzelle

1.3.1. Verschiedene muskulären Phänotypen

Die glatte Muskulatur ist neben der quergesteiften Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur eine dritte spezialisierte Muskelart. Ihre Besonderheit ist, dass sie nach ihrer Differenzierung nicht in einem Zustand verharrt, sondern auch im erwachsenen Organismus auf Reize mit einer Anpassung ihres Phänotyps reagieren kann, welche reversibel sind (12). Einerseits finden die Beschreibungen differenziert und kontraktile Anwendung, andererseits werden synthetisch, entdifferenziert, proliferativ und migratorisch synonym verwendet. Diese Begriffe beschreiben zwei gegensätzliche Zustände, wobei es sich dabei um eine vereinfachte Darstellung handelt, da es diverse Zwischenstufen gibt (13). Die Änderung des Phänotyps kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Darunter fallen Wachstumsfaktoren, mechanische Einflüsse, Zell-Zell-Interaktionen, Zell-Matrix-Interaktionen und Entzündungsmediatoren (13).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob eine gesteigerte Aldosteronkonzentration ebenfalls auslösend für den Phänotypen-Switch sein kann. Dafür wurde das Expressionsverhalten von Markergenen untersucht. Um den Übergang von der kontraktilen zur synthetischen Muskelzelle experimentell zu demonstrieren, wurde der Wachstumsfaktor *platelet derived growth factor-BB* (PDGF-BB) genutzt. PDGF-BB reguliert in vitro Markergene des differenzierten VSMC-Phänotyp herunter (14, 15). Ein Schlüssel der zellulären Plastizität der glatten Muskelzelle ist der Transkriptionsfaktor: *Serum Response Factor* (SRF) (16). Myocardin aktiviert den SRF, welcher an einen bestimmten DNA-Abschnitt (CarG-Box) bindet, sodass die Ausbildung von Proteinen gefördert wird, welche für den kontraktilen Phänotyp typisch sind (u.a. ACTA2 und MYH11) (17). Die nukleäre Bindung des SRF wird durch Faktoren wie Elk-1 (18) und *Krüppel-like factor 4* (19) reduziert. Man konnte beweisen, dass PDGF-BB Elk-1 durch Phosphorylierung blockiert (18) und auch über die Aktivierung von *Krüppel-like factor 4* (19) zu der Reduktion der typischen kontraktilen Proteine führt.

Da der synthetische Phänotyp proliferativ aktiver ist als der kontraktile Phänotyp (13), können Rückschlüsse auf den Phänotyp der Zelle gezogen werden indem man die Expressions-Levels von Ki67 untersucht. Ki67 wird in proliferierenden Zellen stark exprimiert, in ruhenden Zellen hingegen kaum (20).

1.3.2. Marker des Phänotypen-Switch

1.3.2.1. α -Aktin

Aktin ist ein essenzielles Muskelprotein und gehört gemeinsam mit Myosin, Troponin und Troponomyosin zu der kontraktilen Einheit der Muskulatur. Bei einer hoch differenzierten VSMC steht die Aufgabe der Vasokonstriktion im Vordergrund, dementsprechend wird viel α -Aktin exprimiert. α -Aktin kann bis zu 40% des gesamten Zellproteins ausmachen (21). Bei der synthetischen Muskelzelle nimmt der Anteil dieses Muskelproteins ab. Dieses Phänomen macht α -Aktin zu ei-

nem geeigneten Marker des Phänotypen-Switch (12, 13). Die Expression dieses an der Kontraktion der Zelle beteiligten Proteins wird herunterreguliert, wenn die Zelle einen synthetischen Zustand annimmt (12, 13).

1.3.2.2. Schwere Kette von Myosin

Myosin ist ein Motorprotein, welches in unterschiedlichen Formen in allen menschlichen Zellen vorkommt. Für die Muskulatur ist unter anderem die Aufgabe im Querbrückenzyklus von Bedeutung. Hier löst es bei Vorhandensein von ATP und Kalzium gemeinsam mit Aktin eine Kontraktion aus. Das Expressionsverhalten der schweren Kette von Myosin kann Rückschlüsse auf den Phänotyp der VSMC geben (22, 23). Wenn die schwere Kette von Myosin weniger exprimiert wird, übernimmt die Zelle weniger vasokonstriktorische Aufgaben. In den Versuchen wird die Expression der glattmuskulären schweren Kette von Myosin (MYH11) untersucht.

1.3.2.3. Osteopontin

Osteopontin ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches nicht nur im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle spielt, sondern auch bei der Adhäsion und Migration von VSMC nach Verletzungen, bei Hyperplasie, Atherosklerose, Fibrose und Stenose (24). Osteopontin steigt bei zunehmender Proliferation der glatten Muskelzelle an (25), kann also als Marker eines synthetischen Phänotyps angesehen werden. Bei Aldosteronexzess ist die Osteopontinexpression im Herzen von Ratten verstärkt nachzuweisen (26).

1.3.2.4. Spannungsabhängiger Kalziumkanal: Cav1.2.

Der Cav1.2 ist ein membranständiger, spannungsabhängiger Kalziumkanal, aus der Familie der L-Typ Kalziumkanäle (LTCC). Er findet sich in glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen, endokrinen Zellen, neuronalen Zellkörpern und proximalen Dendriten. Der Kanal wird aus 4 Untereinheiten gebildet, wovon die α_1 -Untereinheit als Spannungssensor, Kalzium-sensitive Pore und als Bindungsstelle dient (27). Der Kanal öffnet nach Zelldepolarisation und führt zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Kalzium dient der Zelle als intrazellulärer Messenger und beteiligt sich so an vielen Prozessen, wie z.B. der Muskelkontraktion, Hormonsekretion und der Genexpression (28). In VSMC ist die Kontraktion der Zelle hauptsächlich von der Phosphorylierung der Myosin leichten Kette abhängig (29). Die steigende intrazelluläre Kalziumkonzentration führt direkt zu der Bindung von Calmodulin an der Myosin leichten Kette Kinase und damit zu einer vermehrten Kontraktion. Da eine erniedrigte LTCC-Expression mit einem synthetischen muskulären Phänotyp korreliert (30), können über das Expressionsverhalten Rückschlüsse auf den Phänotyp der Zelle gezogen werden. Die Expression der Marker α -Aktin und Myosin schwere stehen zusätzlich unter dem Einfluss des durch diesen Kanal eintretenden Kalziums (31).

In den VSMC konnte durch spezielle *knock-out* Experimente eine fördernde Wirkung des MR auf die Cav1.2 Kanalexpression festgestellt werden (32, 33). Gleichzeitig gibt es aber auch Quellen, welche von einer unveränderten Kanalexpression berichten (34). Untersuchungen zu dem Einfluss von Aldosteron in VSMC zeigten eine vermehrte Expression der eigentlich kardialen Cav1.2 Form (35).

1.4. Wirkung von Aldosteron

Das Hormon Aldosteron wurde 1953 von Simpson und Tait isoliert (36). Es gehört zu der Klasse der lipophilen, von Cholesterol abstammenden Hormone und ist Bestandteil der Natrium- und Blutdruckhomöostase des Menschen. Die Aldosteronsynthese wird im Menschen hauptsächlich durch das Angiotensin II, Kalium und Adrenocorticotropin kontrolliert (37, 38). Bei der Aldosteronsynthese durch Angiotensin II und Kalium handelt es sich um einen kalziumvermittelten Prozess (38).

Anders als lange Zeit angenommen beschränkt sich die Wirkung von Aldosteron nicht nur auf die Epithelzellen der Nieren. Das Hormon wirkt auch in Epithelzellen (39) und in VSMC (40) über Bindung des Mineralokortikoidrezeptor (MR). Der MR gehört ebenso wie der Glukokortikoidrezeptor (GR) zu den Steroidrezeptoren. Unter Abspaltung von Hitze-Schock-Proteinen wird das Hormon an die Liganden-Bindungs-Domäne des Rezeptors gebunden. Der Hormon-Rezeptorkomplex wandert so in den Zellkern (41) und bindet spezifische *Hormone-Response-Elemente* in den Promotor-Regionen der Zielgene um deren Transkription zu steuern.

Der Wirkungsweg von Aldosteron kann in einen genomischen und einen nicht-genomischen unterteilt werden (42, 43). Die genomische Wirkung von Aldosteron wird über den MR vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte auf die VSMC nur nach 12 h oder nach 24 h bewertet. Schnelle, nicht-genomische Effekte wurden demnach nicht untersucht.

1.4.1. Cortisol, ein weiterer Ligand des MR

Es ist nicht immer eindeutig, ob MR-vermittelte Effekte allein durch einen erhöhten Aldosteronspiegel ausgelöst werden, denn der Rezeptor kann auch von anderen Liganden gebunden werden (44). Das Hormon Cortisol hat die gleiche Affinität zu dem MR wie Aldosteron (45), kommt aber 1000-fach höheren Plasmakonzentrationen vor. Im Plasma ist es zu 95% an Proteine gebunden und kann nur in der ungebunden Form in die Zelle diffundieren. Dennoch ist die Konzentration in der Zelle etwa 100-fach höher als die von Aldosteron (44). Das Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11- β -HSD) wirkt hier regulatorisch, indem es Cortisol zu der inaktiven Form Cortison umwandelt (46). Es gibt aber auch Hinweise für die Funktion von Cortisol als MR-Agonist. Untersuchungen von Kardiomyozyten der Ratte, welche physiologisch keine 11- β -HSD exprimieren, zeigten eine cortisolvermittelte MR-Aktivierung, welche der Funktion von Aldosteron gleicht (47).

1.4.2. Genomische Wirkung von Aldosteron auf die Gefäßmuskelzelle

Lange Zeit wurde die MR-Expression und die Wirkung von Aldosteron auf die Niere beschränkt. Erst 1989 wurde der MR auch in glatten Muskelzellen nachgewiesen (48). Heute ist der MR im kardiovaskulären System von großer pharmakologischer Bedeutung. Das liegt unter anderem an den positiven klinischen Ergebnissen der MR-Blockade durch Spironolacton oder Eplerenon (49, 50).

In Tierexperimenten wurde die Wirkung von Aldosteron auf die glatte Muskelzellen bereits untersucht. Es wurde eine aldosteronvermittelte proliferationsfördernde Wirkung demonstriert (51). Zusätzlich wurde eine aldosteronabhängige Fibrose festgestellt, welche für eine Beeinflussung der Gefäßstruktur sprach (51, 52). Dies steht auch im Zusammenhang mit der experimentell gezeigten, aldosteroninduzierten Förderung von atherosklerotischen Läsionen (53).

Um die Signaltransduktion von Aldosteron in der VSMC besser verstehen zu können wurde das Expressionsverhalten verschiedener Kanäle untersucht.

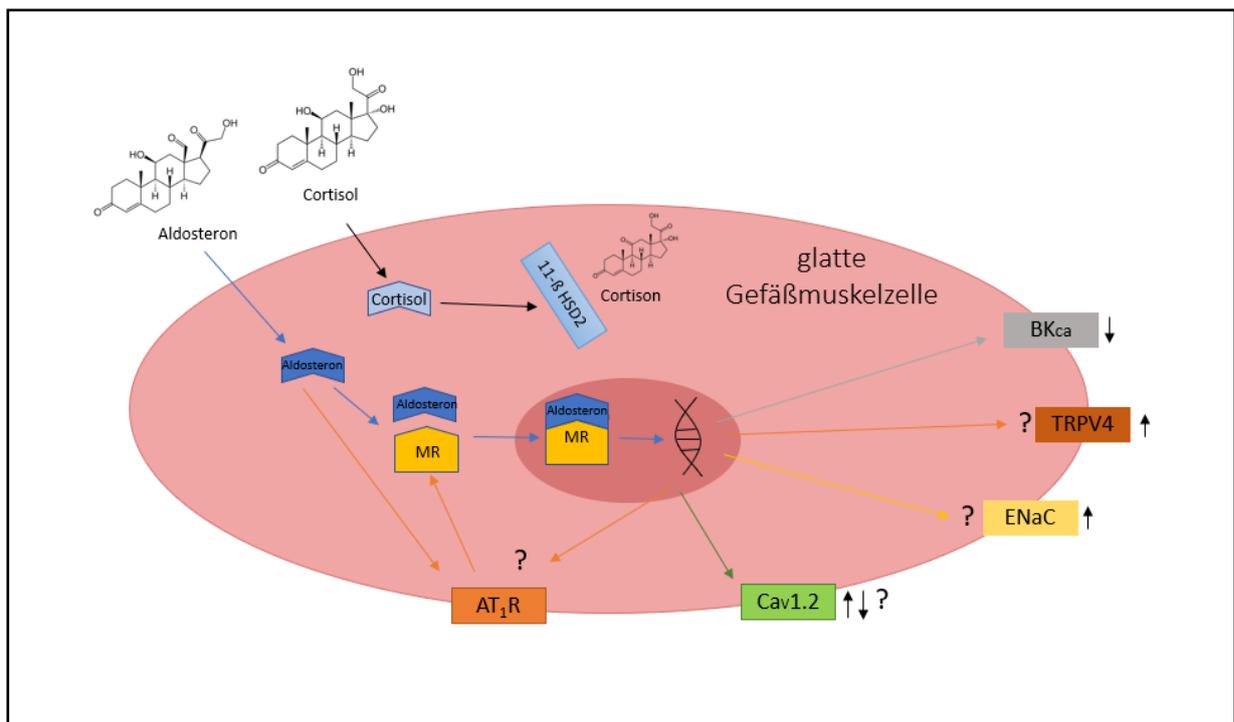


Abbildung 2: Schematische Darstellung bekannter und hypothetischer transkriptioneller Wirkungen von Aldosteron in der Gefäßmuskelzelle. Aldosteron diffundiert aufgrund seines lipophilen Charakters durch die Zellmembran und kann den zytosolständigen MR binden. Auch Cortisol kann in die Zelle diffundieren und theoretisch den MR binden, wird dort aber teilweise durch 11- β HSD Typ 2 in das inaktive Cortison umgewandelt. Der Aldosteron-Rezeptorkomplex wandert in den Zellkern und wirkt über Transkriptionsfaktoren auf die Gentranskription. In VSMC ist eine aldosteroninduzierte Aktivierung des Angiotensin-II Rezeptor Typ 1 bekannt (AT₁R, Gen: AGTR1). AT₁R aktiviert zwar den MR, aber zu der Frage, ob eine Rückkopplung auf die AGTR1-Expression besteht, gibt es bisher keine Untersuchungen. Die Transkription des L-Typ-Kalziumkanals wird MR-abhängig beeinflusst. Hier gibt es widersprüchliche Ergebnisse (siehe: 1.3.2.4. Spannungsabhängiger Kalziumkanal: CaV1.2). Zu dem epithelialen Natriumkanal und dem TRPV4 gibt es speziell in VSMC keine Untersuchungen. Die Expression vom BKCa wird in VSMCs in Abhängigkeit von Aldosteron herunterreguliert. 11- β HSD2 = 11- β -Deoxysteroid-Dehydrogenase, MR = Mineralokortikoidrezeptor, ENaC = epithelialer Natriumkanal, AGTR1 = Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1, CaV1.2 = L-Typ Kalziumkanal, BKCa = „big conductance“ kalziumaktivierter Kaliumkanal, TRPV4 = „transient receptor potential“ (TRP)-Kanal 4 der Vanilloidrezeptor-ähnlichen Subfamilie.

1.4.2.1. Der Angiotensin-II Rezeptor Typ 1 (AT₁R)

Der Angiotensin-II Rezeptor Typ 1 (AT₁R, Gen: AGTR1) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welcher unter anderem G_q-vermittelt über eine Aktivierung der Phospholipase C und vermehrter Bildung von IP₃ Vasokonstriktion auslöst (54). Eine Beziehung zwischen Aldosteron und der AGTR1-Expression konnte bereits 1985 in einem Zellkulturmodell gezeigt werden (55). In den VSMC kann der MR über den AGTR1 aktiviert werden (56). AGTR1 scheint mittelbar über MR-Aktivierung negativ reguliert zu werden: MR erniedrigt die Promoteraktivität von miRNA-155, welche wiederum die Expression von Agtr1a und Agtr1b (die beiden Maus-Isoformen des AT₁R) reduziert (33).

1.4.2.2. Der epitheliale Natriumkanal

Der epitheliale Natriumkanal (eNaC) ist ein Transmembrankanale, welcher Natrium in dem Sammelrohr der Niere in die Zelle transportiert und somit die Homöostase beeinflusst. Klassischerweise sorgt ein erhöhter Aldosteronspiegel in der Niere, über die Aktivierung des MR, zu einer gesteigerten Dichte dieser Kanäle (57). Die Untereinheiten α , β und γ bilden den Kanal als ein Heterotrimer (58). Eine genetische Veränderung der β - oder γ -Untereinheit führt zu einer Steigerung der ENaC-Aktivität, welche sich klinisch mit einer Hypertonie äußert (59, 60). Zusätzlich gibt es die δ -Untereinheit, welche in Endothelzellen nachgewiesen wurde. Sie scheint unter dem Einfluss von Angiotensin-II zu stehen (61). In in vivo und ex vitro Endothelzellen konnte ein fördernder Einfluss von Aldosteron über den MR auf die eNaC-Kanalexpression beobachtet werden, der zu einer erhöhten Gefäßsteifigkeit führte (62).

Der Nachweis des Kanals in den VSMC erfolgte in den 2000er Jahren (63). In den glatten Gefäßmuskelzellen wird eine Funktion des Kanals als Mechanosensor in der Regulation des myogenen Tonus postuliert (64–66). Wobei hier vor allem die β -Untereinheit eine Rolle zu spielen scheint (67, 68). Es fehlen zu diesem Thema vertiefende Untersuchungen welche erörtern, ob und wie

der MR den ENaC in den VSMC fördert und welche Rolle das Zusammenspiel von Endothel- und Muskelzellen hat (69).

1.4.2.3. Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie

Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie (TRPV4) gehört zu der Familie der *transient receptor potential*-Ionenkanäle, welche für Kationen durchlässig sind. Insgesamt gibt es sechs Klassen TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPP und TRPA1, welche alle aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut sind (70). In dem Gefäßsystem wird seine Funktion in der Regulation des vaskulären Tonus gesehen (71). Das Vorkommen des Kanals ist vielseitig und konnte auch in VSMC bestätigt werden (72). Wärme, Dehnung und Liganden können den Kanal aktivieren (73). In Folge der TRPV4-Kanalaktivierung kommt wegen des Kalziumeinstroms zu Kalzium-*Sparklets*, welche den Ryanodin Rezeptor (RyR) und daraufhin den kalziumaktivierten Kaliumkanal aktivieren (72).

Eine Beziehung zwischen der Expression von TRPV4 und Aldosteron wurde 2017 indirekt beschrieben. In einem Tierexperiment wurden Mäuse mit einer Kaliumdiät behandelt, welche zu erhöhten TRPV4 mRNA- und Proteinlevels in der Niere führte (74). Da Kalium die Aldosteronsynthese fördert, kann hier eine aldosteronvermittelte Wirkung vermutet werden. Diese These wird gestützt durch die Erkenntnisse von Diaz-Otero et al., welche eine MR-abhängige TRPV4-Expression in Blutgefäßen von Mäusen demonstrierten (75).

1.4.2.4. Der BK_{Ca} -Kanal

Der kalziumaktivierte Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit (**big conductance**) (BK_{Ca} -Kanal) besteht aus vier α - und vier β -Untereinheiten. Die α -Untereinheit hat je sechs Transmembrandomänen, welche insgesamt die kaliumdurchlässige Poren formen (76). Je nach Gewebe ist der Kanal aus unterschiedlichen β -Domänen (β 1- β 4) aufgebaut (77). Spannungsänderungen (78) sowie Kalzium-*Sparks* durch den RyR (79) aktivieren den Kanal. Durch die Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration kommt es zur Hyperpolarisation der Zelle und dadurch zur Limitierung des Kalziumanstiegs durch spannungsabhängige Kalziumkanäle (80). Der BK_{Ca} ist somit an der Regulation des vaskulären Tonus der Blutgefäße beteiligt (81).

Die Beziehung zwischen Aldosteron und dem BK_{Ca} wurden 2005 in einem experimentellen Mäuse-*knock-out* Modell von Sausbier et al. aufgezeigt. Die BK_{Ca} *knock-out* Mäuse zeigten einen erhöhten Aldosteronspiegel und waren hypertensiv (82). Ambroisine et al. konnten eine umgekehrte Relation demonstrieren. Eine erhöhte A-Konzentration führte dort in Abhängigkeit von dem MR zu einer Abnahme der BK_{Ca}-mRNA in den VSMC von Ratten (83).

1.5. Vasorelaxierende endotheliale Faktoren

Das Endothel steht als gefäßauskleidende Zellschicht zwischen den VSMC und dem Gefäßlumen. Es übernimmt neben der Aufgabe als Barriere zwischen dem Blutvolumen und den Muskelzellen auch wichtige andere Funktionen. Diese betreffen Entzündungsreaktionen, Wachstum, Blutgerinnung und die Beeinflussung der Gefäßkontraktion. Die auf die Gefäßkontraktion Einfluss nehmenden Substanzen wirken parakrin und können in drei Gruppen aufgeteilt. Erstens das von der Stickstoffmonoxid-Synthese produzierte NO (84). Zweitens das von der Cyclooxygenase aus der Arachidonsäure gebildeten Prostaglandine I₂ und drittens die von Cytochrom-P450 Enzymen, ebenfalls aus der Arachidonsäure gebildeten Epoxyeicosatriensäuren (EETs) (85). Die dritte Gruppe wurden in den 90er Jahren den *endothelium derived hyperpolarisation factors* (EDHF) zugeordnet (86).

1.5.1. Epoxyeicosatriensäuren

Die Arachidonsäure ist in den Membranphospholipiden an zweiter Position eingebaut und wird durch cytosolische Phospholipasen A₂ abgespalten. Je nach Enzym können aus der Arachidonsäure unterschiedliche Derivate entstehen. Durch Cyclooxygenasen die Prostacycline, Prostaglandine und Thromboxane; durch Lipoxygenasen werden Leukotriene und Lipoxine gebildet; durch die Cytochrom P450-Enzyme die EETs sowie die Hydroxyeicosatriensäuren (87). Stimuli für die EET-Synthese in Endothelzellen sind Acetylcholin, Bradykinin und die Wandschubspannung (*shear stress*) (85, 88).

Es werden die vier Regioisomere 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET und 14,15-EET unterschieden, wobei 11,12- und 14,15-EET überwiegen (87). EETs werden im Blutgefäß vor allem in Endothelzellen durch CYP-Epoxygenasen gebildet. In glatten Gefäßmuskelzellen dominieren CYP-Hydrolasen, welche die Hydroxyeicosatriensäuren bilden (89). Die vasodilatationsfördernde Wirkung von 11,12- und 14,15-EET auf die VSMC entsteht über unterschiedliche Signalwege. Zum einen aktivieren EETs die BK_{Ca}-Kanäle in der Membran der Muskelzellen (90, 91). Hierbei spielt auch der TRPV4-Kanal mit der Generierung von Kalzium-*sparklets* und der Aktivierung von Ryanodinrezeptoren eine wichtige Rolle (72). Dieser Kanal wird ebenfalls von den EETs aktiviert (91, 92). Ein anderer Signalweg ist die Übertragung von der in der Endothelzelle generierten Spannungsabnahme über *Gap-Junctions*. Diese setzt die Öffnungswahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen Kalziumkanäle in der Zellmembran der Muskelzellen herab. (93) Ein dritter Signalweg stellt die Deaktivierung der Phospholipase C durch die EETs dar, wodurch weniger Inositoltrisphosphat (IP₃) der Zelle zur Verfügung steht (94). Dies führt zu einer Abnahme der Kontraktion der Muskelzelle. Alle beschriebenen Effekte führen auf unterschiedlichen Wegen zu einer Abnahme der Muskelkontraktion, was sich in den Blutgefäßen schlussendlich in einer Vasodilatation äußern kann.

Die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) und die mikrosomale, membrangebundene Epoxidhydrolase (mEH) katalysieren die Umwandlung der EETs in Dihydroxyeicosatriensäuren (DHETs). Wobei

14,15-EET das Hauptsubstrat für die lösliche Epoxidhydrolase ist. (87, 95) Den DHETs konnte bisher keine essentielle Aufgabe zugeordnet werden (96) und man nimmt allgemein an, dass es sich um die inaktive Form der EETs handelt (97).

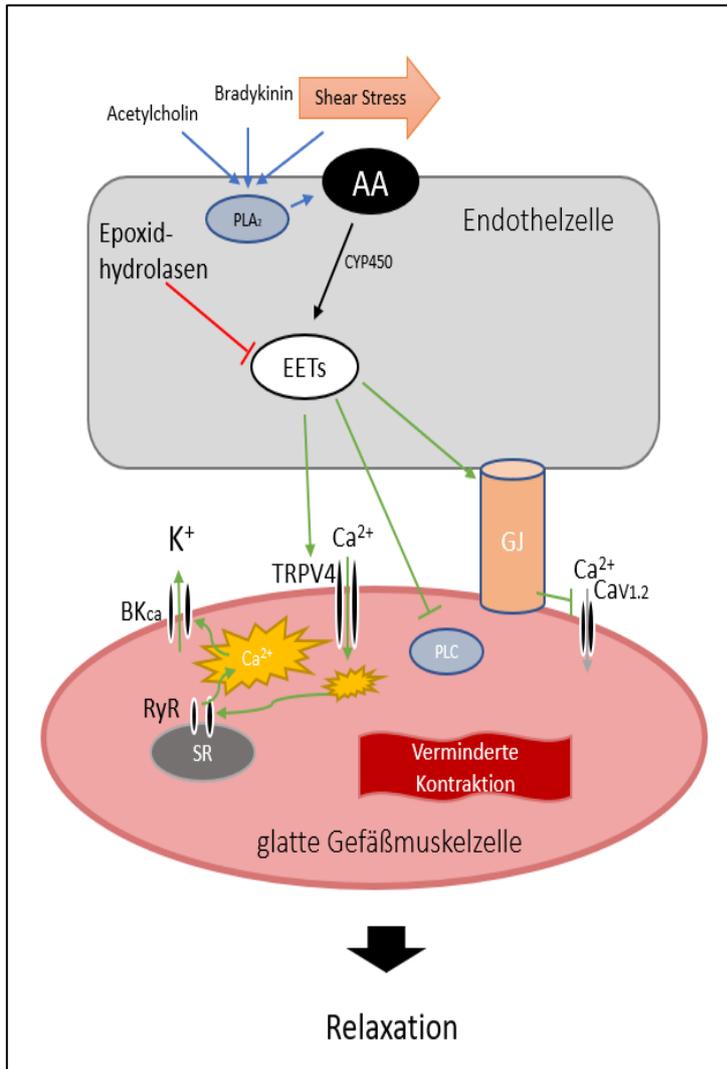


Abbildung 3: Wirkung von EETs auf die VSMC: EETs werden in den Endothelzellen über Cytochrom P450 aus Arachidonsäure gebildet. Auslösender Faktor können z. B. das Peptidhormon Bradykinin, der Neurotransmitter Acetylcholin oder Wand Schubspannung (shear stress) durch den Blutstrom sein. Durch die Epoxidhydrolasen werden EETs in DHETs umgewandelt. EETs können den nichtselektiven Kationenkanal TRPV4 in VSMC aktivieren, welcher durch seinen Kalziueinstrom für RyR-aktivierende Kalzium sparklets sorgt. Diese wiederum aktivieren den BKCa -Kanal. Dadurch kommt es zu einer Hyperpolarisation der Zelle und einer Reduktion des (sonst ständig stattfindenden) Kalziueinstroms durch spannungsabhängige Kalziumkanäle. Diese spannungsabhängigen Kanäle werden auch durch die Übertragung von hyperpolarisierenden Strömen über Gap Junctions gehemmt. Auf einem dritten Weg inhibieren EETs die Phospholipase C, wodurch die glatte Muskelzelle relaxiert. AA = Arachidonsäure, BKCa = kalziumgesteuerter Kaliumkanal mit großer Leitfähigkeit, Ca²⁺ = Kalzium, CYP P450 = Cytochrom P450, DHET = Dihydroeicosatriensäure; EET = Epoxyeicosatriensäuren, GJ = Gap Junction; RyR= Ryanodin Rezeptor, TRPV4 = TRP- Kanal 4 der Vanilloidrezeptor-ähnlichen Subfamilie. (Abbildung nach (85, 93, 94)).

1.5.2. Epoxyeicosatriensäuren und der primäre Hyperaldosteronismus

Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aldosteronkonzentration und den Epoxyeicosatriensäuren ist weitestgehend unerforscht. Es gibt Untersuchungen zu sEH-Inhibitoren (sEHI) und EETs im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, welche für den PHA von Bedeutung sind. Veränderungen der EET-Synthese haben Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem. Das zeigte sich am Beispiel von Polymorphismen der sEH, welche mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher geht (98, 99).

Nachdem eine Reduktion des Blutdrucks durch die Injektion von sEHI an hypertensiven Ratten demonstriert wurde (100), folgten weitere Untersuchungen in diesem Bereich (101, 102). Eine

Patientenstudie untersuchte den Zusammenhang von EETs und koronarer Herzkrankheit. Es zeigte sich dass ein erniedrigtes Level von zirkulierenden EET-Metaboliten statistisch mit der koronarer Herzkrankheit in Verbindung steht (103). Inhibition der löslichen Epoxidhydrolase könnten demnach einen therapeutischen Nutzen bei Erkrankungen des Blutgefäßsystems haben (104).

Zu dem Effekt von Hyperaldosteronismus auf zirkulierende EETs gibt es eine Studie, welche untersuchte ob PHA-Patienten im Vergleich zu essenziellen Hypertonikern veränderte 14,15-DHET-Konzentrationen aufweisen. Die Konzentration von 14,15-DHET war bei PHA-Patienten erhöht. (105) Die erhöhte DHET-Konzentration deutet auf einen vermehrten Abbau der EETs bei PHA hin. Ratten, welche mit Desoxycorticosteronacetat, einer Vorstufe von A, und Salz hypertonisch wurden, zeigten nach sEHI-Behandlung keinen weiteren Anstieg der Hypertonie (106).

2. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es, die Expression ausgewählter Gene der Gefäßmuskelzelle nach Aldosteron-Exzess in einem Zellkulturmodell zu untersuchen. Dafür wurden die Zellen experimentellen Bedingungen ausgesetzt, welche schrittweise komplexer wurden, um der physiologischen Situation so nah wie möglich zu kommen. Die Expressionsänderungen wurden mittels qPCR detektiert und statistisch ausgewertet. Durch eine Rezeptorblockade des MR mittels Eplerenon wurde die Wirkung von Aldosteron über diesen Rezeptor antagonisiert mit dem Ziel, den Anteil der MR-Effekte zu demaskieren. Als Teilfrage wurde untersucht, ob Hydrocortison synergistisch zu Aldosteron genomische, MR-vermittelte Effekte auf die Zellen ausübt, oder ob die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 die Wirkung über den MR verhindert. Der Physiologie der Zellen nachempfunden konkurrieren demnach in dem gewählten Zellkulturmodell Hydrocortison und Aldosteron um den MR.

Es wurden drei bisher ungeklärte pathophysiologische Zusammenhänge untersucht: erstens ob es aldosteroninduziert zu einem glattmuskulären Phänotypen-Switch kommt, zweitens ob die Genexpression für MR-Selektivitätsfilter (11 β -HSD1 und 11 β -HSD2) durch Aldosteron beeinflusst werden, drittens in welcher Form die Zugabe von 14,15-EET Potential aufweist, aldosteroninduzierte Expressionsänderungen in der Gefäßmuskelzelle zu revidieren. Die Zielstrukturen hierfür wurden zuvor durch intensive Literaturrecherche ausgewählt. Wurde experimentell ein potenzieller Marker für die genomische Veränderung gefunden, sollte dies auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Funktionell sollte überprüft werden, ob die Wirkung von durch das Endothel sezernierten Eicosanoiden, in diesem Fall 14,15-EET, durch Aldosteron beeinflusst wird. Dafür diente die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Zugabe von 14,15-EET.

3. Methoden und Material

3.1. Methoden

Für die Durchführung der Experimente standen die Räumlichkeiten der endokrinologischen Forschung in der Ziemssenstraße 1, in München, unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Reincke zur Verfügung. Zusätzlich wurden mit freundlicher Erlaubnis von Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler Räumlichkeiten des Walther Straub-Institutes für die Experimente genutzt.

3.1.1. Zellkultur

Glatte Muskelzellen aus humanen Koronararterien gesunder Spender (Katalognummer CC-2583, Lonza, Basel, Schweiz) dienen als Basis für alle Experimente. Nach einer ersten Proliferationsphase werden jeweils etwa 500 000 Zellen pro Gefäß im Stickstofftank untergebracht, um stets in einer niedrigen Passage vorrätig zu sein. Die Behandlung der Zellen erfolgt nach dem Protokoll der Firma Lonza. Das Basalmedium der Firma Lonza wird nach Gebrauchsanweisung mit humanem epidermalem Wachstumsfaktor, Insulin, humanem Fibroblasten Wachstumsfaktor-Beta, fetalem Kälberserum sowie Gentamicin/Amphotericin-B supplementiert. Alle zwei bis drei Tage erfolgt ein Austausch des Mediums. Nach sieben bis zehn Tagen werden die Zellen in Subkulturen aufgeteilt. Die Pufferlösung 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und Trypsin-Neutralisationslösung werden im weiteren Verlauf durch Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung substituiert. Die Anzucht der Zellen findet in Kulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm² statt und die Zellen werden im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C einem CO₂-Gehalt von 5%, einem O₂-Gehalt von 95 % und einer relativen Feuchtigkeit von 96% gehalten. Für die Experimente finden stets Zellen der Passage 3 bis 7 Verwendung.

Im Folgenden wird auf die drei unterschiedlichen Behandlungen der Zellen in Vorbereitung auf die Experimente für RT-qPCR, Western-Blot und Kalzium-Bildgebung eingegangen.

3.1.1.1. Behandlung der Zellen für die qPCR

Für die RT-qPCR werden die Zellen in Multiwellplatten ausgesät. Nachdem die Zellen mindestens 24 Stunden an der Plattenoberfläche adhären können und die Zelldichte bei 80 % liegt, wird eine zehnstündige Serum *starvation* begonnen.

Anschließend folgt die 24- oder 48-stündige Behandlung der Zellen mit Basalmedium und folgenden Zusätzen:

1. DMSO
2. Aldosteron (A) 100 nM
3. A 100 nM + Eplerenon (Ep) 2 μ M
4. A10 nM
5. A 10 nM + Ep 2 μ M
6. DMSO + F 140 nM
7. Hydrocortison (F) 140 nM + A 1nM
8. F 140 nM + A 1 nM + Ep 2 μ M
9. PDGF-BB 10 ng/ml
10. DMSO + F 140 nM + 14,15-EET 1 μ M
11. F 140 nM + A 1 nM + 14,15-EET 1 μ M
12. DMSO + F 140 nM + 14,15-EET 1 μ M + EE-5(Z) 10 μ M
13. F 140 nM + A 1 nM + Mifepriston (RU486) 1 μ M
14. F 140 nM + A 1 nM + Ep 2 μ M + RU486 1 μ M
15. A 1 nM + Ep 1 nM
16. A 1 nM + Ep 2 μ M + RU486 1 μ M
17. A 1 nM + Ru486 1 μ M
18. DMSO + F 140 nM + RU486 1 μ M
19. DMSO + F 140 nM + Ep 2 μ M + RU486 1 μ M

In den Gruppen 13 bis 19 erfolgt im Voraus eine 30-minütige Behandlung mit dem GR-Antagonist RU486 (Mifepriston).

3.1.1.2. Behandlung der Zellen für den Western-Blot

Die Zellen werden in 10 cm² Kulturplatten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80 % wird eine zehnstündige Serum *starvation* mit dem reinen Basalmedium durchgeführt. Die Behandlung bestand aus drei unterschiedlichen Substanzmischungen, entsprechend der Punkte 6. bis 8., welche unter 0 beschrieben sind. Die Behandlung dauert jeweils 48 Stunden.

3.1.1.3. Behandlung der Zellen für die Kalzium-Bildgebung

Die Zellen werden in Multiwell-Platten ausgesät. Zusätzlich wird in jedes „well“ eine 24 mm Glas-scheibe eingelegt, auf welcher die Zellen adhärent wachsen. Bei einer Konfluenz von etwa 60 % folgt eine Serum *starvation* von 4 Stunden. Aufgrund der langen zeitlichen Erstreckung der Kalziumexperimente wird hier von den 10 Stunden abgewichen. Danach erfolgt die Behandlung für 48 Stunden mit den Substanzen:

1. DMSO + F 140 nM
2. F 140 nM + A 1nM
3. F 140 nM + A 1 nM + Ep 2 µM

3.1.2. Molekularbiologische Verfahren

3.1.2.1. qPCR

Die Real-Time Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Verfahren zusammen. Nach der Umwandlung von RNA in cDNA folgt die Vervielfältigung der cDNA, woraufhin die Amplifikate der PCR in Echtzeit detektiert und quantifiziert werden können(107).

Prinzip der qPCR

Die PCR dient dem Nachweis von spezifischen Nukleinsäure-Bereichen. Dafür benötigt man passende Oligonukleotidprimer, die Ziel-DNA (Template), eine thermostabile DNA-Polymerase und Nukleotide. Die Reaktion wird über spezifische Temperaturabfolgen wie folgt gesteuert:

Tabelle 1: Aufbau der Temperaturwechsel bei der RT-qPCR

	Temperatur	Zeit	Zyklus
Aktivierung der Polymerase	95 °C	30 s	1x
Denaturierung	95 °C	15 s] → 55x
Extension	60 °C	20 s	
Ende	4 °C	∞	

Für den Einsatz der DNA-Polymerase gibt es verschiedene Möglichkeiten. Neben der Verwendung von unspezifischen Farbstoffen (zB. SYBR® Green) kann man auch sondenspezifisch Nukleinsäuren nachweisen. Das hier verwendete Sondendesign arbeitete über eine Hydrolysesonde mit dem Namen TaqMan®. Dabei handelt es sich um eine thermostabile DNA-Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde (108). Mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM-phosphoramidit konnten in Echtzeit die Fluorophor markierten sequenzspezifischen Sonden gemessen werden. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die Expression des Zielgens zu der Expression eines Referenzgens und der negativen Kontrolle normalisiert. Mit der vergleichenden „delta-delta C_T“-Methode wurde die relative Veränderung der Genexpression festgestellt (109). Hierbei wurde zunächst der C_T-Wert des Referenzgens von dem C_T-Wert des untersuchten Zielgens subtrahiert und anschließend der Δ-C_T-Wert einer Kontrollbehandlung abgezogen (110).

Mathematisch lässt sich dies in folgendem Term zusammenfassen:

Formel 1

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die Herleitung für diesen Termin beginnt ausgehend von der Formel, welche die exponentielle Amplifikation der PCR beschreibt:

Formel 2

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)_n$$

X_n = Anzahl der cDNA-Moleküle von Zielgen X beim PCR-Zyklus n

X₀ = Ursprüngliche Anzahl der cDNA-Moleküle von Zielgen X

E_x = Effizienz der PCR auf Zielgen X

n = Anzahl der PCR-Zyklen

Bei Integration des C_T-Wertes, welcher die Anzahl der Zyklen widerspiegelt, welche zum Erreichen des Fluoreszenzniveaus nötig sind, ergibt sich folgende Formel:

Formel 3

$$X_T = X_0 \times (1 + E_x)^{C_{T,X}} = K_X$$

X_T = Anzahl der Moleküle des Zielgens bei Erreichen des Fluoreszenzniveaus (Threshold)

C_{T,X} = Anzahl der notwendigen PCR-Zyklen auf Zielgen X zum Erreichen des Fluoreszenzniveaus (threshold cycle für X)

K_x = Konstante

Für die endogene Kontrolle ergibt sich die Formel:

Formel 4

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R$$

- R_T** = Anzahl der cDNA-Moleküle von Referenzen R beim bei Erreichen des Fluoreszenzniveaus (Threshold)
- R_0** = Ursprüngliche Anzahl der cDNA-Moleküle von Referenzen R
- E_R** = Effizienz der PCR auf Referenzen R
- $C_{T,R}$** = Anzahl der notwendigen PCR-Zyklen auf Referenzen R zum Erreichen des Fluoreszenzniveaus (threshold cycle für R)
- K_R** = Konstante

Wenn man X_T durch R_T dividiert erhält man:

Formel 5

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

Die Werte X_T und R_T sind von verschiedenen Faktoren abhängig, und müssen nicht unbedingt Eins entsprechen. Wenn man annimmt, dass Ziel- und Referenz-Amplifikation identisch sind ($E_X = E_R = E$) kommt man zur nächsten Formel:

Formel 6

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

- X_N** = X_0/R_0 , Auf Referenzen R normalisierte Expression des Zielgens X
- ΔC_T** = $C_{T,X} - C_{T,R}$, Differenz des Threshold cycles für Ziel- und Referenzen

Diese Formel kann umgeformt werden zu:

Formel 7

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

Zum Schluss wird X_N für jede experimentelle Probe (q) durch X_N einer Kontrollprobe (cb) geteilt:

Formel 8

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

Wobei:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}$$

Bei der Annahme von einer Effizienz gleich oder nahezu Eins, ergibt sich für ein Zielgen, normiert auf die endogene Kontrolle und relativ zur Kontrollbehandlung:

Formel 9

$$\text{Relative Expression eines Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

((109))

Für die Auswahl der Referenzgene wird eine Vorauswahl von sechs Genen getroffen. Unter diesen werden die zwei stabilsten Referenzgene für die Versuchsreihe mittels relativer Quantifizierung bestimmt. Zur Berechnung dient das Programm *Normfinder* (111). Hierbei werden die Variation der Gene innerhalb der untersuchten Gruppen sowie ihre Stabilität zwischen den Gruppen beurteilt und als Stabilitäts-Wert ausgedrückt. Je kleiner der Stabilitätswert desto geringer die Abweichung in den Gruppen und auch zwischen den Gruppen; daher ist ein kleiner Wert optimal. Mittels des zur Verfügung gestellten Excel-Tools wird über mehrere Zwischenschritte der Stabilitätswert errechnet.

Jedes Gen wird in mindestens drei unabhängigen RT-qPCR Durchgängen erfasst. Dabei werden die Einzelergebnisse als Mittelwert zusammengefasst und mit Standardfehler des Mittelwertes aus der Anzahl (n) von Experimenten angegeben (SEM).

Die Überprüfung von signifikanten Unterschieden erfolgt im Programm GraphPad Prism (Version 3.02, 2000) mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-way-ANOVA) und falls dieser positiv ausfällt, auch mit einem post-hoc-Test. Dazu dient der Tukey-Test, der Test nach Sidak oder nach Dunnett. P-Werte < 0,05 werden als signifikant angesehen.

Praktische Anwendung:

- Behandlung der Zellen (siehe: Behandlung der Zellen für die RT-qPCR)
- Basalmedium entfernen
- Zellgefäße mit 1 ml DPBS waschen
- Mechanische Entfernung der Zellen unter Zugabe von 1 ml DPBS mittels Zellschabern
- Zellen in Pufferlösung in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß sammeln
- 4-minütiges Zentrifugieren bei 3500 Umdrehungen pro Minute (rpm) und Raumtemperatur
- Entfernung des Überstands
- RNA Extraktion nach dem Protokoll des *Maxwell® purification kit*:
 - 10 µl 1-Thioglycerol pro 0,5 ml Homogenisierungslösung ergibt die Thioglycerol-Homogenisierungslösung

- Pro Zellpellet werden 200 µl dieser Thioglycerol-Homogenisierungslösung hinzugefügt
- Nach gründlichem vortexen Zellen auf Eis legen
- Zugabe von 200 µl Lysis-Puffer und 25 µl Proteinase-K pro Probe
- Vortexen für 15 Sekunden
- 10-minütige Lagerung der so vorbereiteten Proben bei Raumtemperatur
- Vorbereitung der Kammern
- Beladen der Kammern nach dem vorgegebenen Pipettiermuster
- Starten des Programms zur Aufreinigung der Nukleinsäuren
- Messung der RNA-Konzentration mittels Nano-Drop
- Reverse Transkription:
 - Je 100 ng RNA werden mittels des Protokolls GoScript™ in cDNA umgeschrieben
 - Hinzugabe von GoScript™-Reverse Transcription-Mix bestehend aus je: 4 µl GoScript™ Reaktion Puffer, Oligo(dT); 2 µl GoScript™ Enzym Mix ; 4 µl Nuklease freiem Wasser; der RNA-Probe und je nach Konzentration der RNA-Probe weiteres Nuklease freies Wasser
 - Starten des Programms zur Konvertierung von RNA in cDNA (25 °C für 5 Minuten, 42 °C für 60 Minuten, 70 °C für 15 Minuten und ein Halten auf 4 °C)
- Gewonnene cDNA wird 1:20 oder 1:10 mit Nuklease freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert
- Herstellung des Super-Mix für die RT-qPCR: je cDNA-Probe werden 10 µl „iTaQ universal super mix“ mit 8 µl Nuklease-freiem Wasser und 1 µl TaqMan-Gensonden gemischt
- Je 19 µl dieser vorbereiteten Flüssigkeit wird in ein „well“ der gekühlten 96-Well-Platte gebracht
- Hinzugabe von 1 µl cDNA zu den so vorbereiteten „wells“
- Pro „well“ wurde auch eine Negativ-Kontrolle mit 1 µl Nuklease-freiem Wasser durchgeführt
- Verschluss der Platte mit Schutzfolie
- Zentrifugieren bei 900 rpm für 2 Minuten

Getestete Gene:

Tabelle 2: Aufzählung aller verwendeten Taq-Man-Proben von Thermo Fisher Scientific

	Gen	Bestellnummer	Amplifikationsgröße	TaqMan-Proben Typ
1	EIF2B1	Hs00426752_m1	75 Basenpaare	FAM, MGB
2	ELF1	Hs00152844_m1	76 Basenpaare	FAM, MGB
3	PPIA	Hs99999904_m1	98 Basenpaare	FAM, MGB
4	HPRT1	Hs99999909_m1	100 Basenpaare	FAM, MGB
5	YWHAZ	Hs00237047_m1	70 Basenpaare	FAM, MGB
6	GAPDH	Hs00266705_g1	74 Basenpaare	FAM, MGB
7	ACTA2	Hs05005341_m1	83 Basenpaare	FAM, MGB
8	MKI67	Hs01032437_m1	77 Basenpaare	FAM, MGB
9	SPP1	Hs00959010_m1	84 Basenpaare	FAM, MGB
10	TRPV4	Hs01099348_m1	65 Basenpaare	FAM, MGB
11	EPHX1	Hs01116806_m1	61 Basenpaare	FAM, MGB
12	EPHX2	Hs00932316_m1	59 Basenpaare	FAM, MGB
13	EPHX3	Hs00227184_m1	80 Basenpaare	FAM, MGB
14	KNCMA1	Hs01119504_m1	75 Basenpaare	FAM, MGB
15	SCNN1A	Hs00168906_m1	63 Basenpaare	FAM, MGB
16	MYH11	Hs00975796_m1	53 Basenpaare	FAM, MGB
17	NR3C2	Hs01031809_m1	68 Basenpaare	FAM, MGB
18	HSD11B1	Hs01547870_m1	67 Basenpaare	FAM, MGB
19	HSC11B2	Hs00388669_m1	50 Basenpaare	FAM, MGB
20	CACNA1C	Hs00167681_m1	103 Basenpaare	FAM, MGB
21	AGTR1	Hs01096941_m1	129 Basenpaare	Fam, MGB

Mittels des Programms Quant Studio™ wird die PCR-Maschine bedient.

3.1.2.2. Western-Blot

Das Western-Blot dient dem Nachweis von Proteinen auf einer Trägermembran. Nach dem Proteintransfer, in diesem Fall mittels Elektrophorese, folgt die die Blockierung freier Proteine auf einer Membran. Im Anschluss findet die Detektion der Zielproteine mittels spezifischer Antikörper statt.

Praktische Anwendung:

- Behandlung der Zellen (siehe: Behandlung der Zellen für den Western-Blot)
- Basalmedium entfernen
- Zellgefäße mit 3 ml DPBS waschen
- *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) und Proteinase-Inhibitor in dem Verhältnis 1:25 werden vermischt und je 200 µl dem Zellgefäß zugegeben
- Mechanische Entfernung der Zellen mittels Zellschabern

- Zellen in 1,5 Mikroreaktionsgefäßen sammeln
- Homogenisierung bei 4 °C
- Zentrifugieren zur Trennung von Zellen und Proteinen für 15 min bei 15 000 rpm und 4°C
- Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführen
- Individuelle Proteinkonzentration mittels *Pierce™ BCA Protein Assay* bestimmen:
 - Spektrophotometrische Quantifizierung des Proteins mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät (*Fluostar Omega BMG Labtech, Software Version 511.R3*)
 - Auswertung über eine Verdünnungsreihe bekannter Proteinkonzentrationen mit dem Programm *Omega Data Analysis –Version Mars 3.31 BMG Labtech*
- Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese:
 - Lämmli-Puffer mit β -Mercaptoethanol mischen (5 %)
 - Proteine in einer Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit 5 bis 10 μl des zweifachen Lämmli-Puffers mischen und für 5 min bei 95 °C und 300 rpm im *Eppendorf Thermomixer compact* vermischen, um eine lineare Proteinstruktur zu erhalten
 - Bei 15000 rpm und 4 °C die Proben zentrifugieren, um das Kondenswasser abzufangen
 - *MINI-Protean® TGX Gels* in die vorgesehene Halterung des *Mini-Protean Tetra Systems* einbringen
 - Kamm und den Klebestreifen am Boden des Gels entfernen
 - Elektrophorese-Puffer (80 ml 10-facher Elektrophorese Puffer mit 720 ml H₂O) hinzufügen
 - Gelkammern mit den vorbereiteten Proteinproben und dem Kaleidoskop-Standard befüllen
 - Eine Spannungsquelle (80 Volt für 5 - 10 Minuten und 120 Volt für 30 - 60 Minuten) anschließen
- Übertragung der Proteine von dem Gel auf die zuvor in Methanol eingelegte Polyvinylidendifluorid-Membran in einem *Semi-Dry Blot System*
- Blockierung der freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit entfettetem Milchprotein (5 % Milchpulver in *Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T)*) für eine Stunde
- dreifaches Waschen mit TBS-T
- Inkubation mit einem monoklonalen anti-KCNMA1-Antikörper für 24- 48 Stunden bei 4 °C, welcher in einer Konzentration von 1:500 in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) und TBS-T gelöst wurde

- Entfernung unspezifisch gebundene Antikörper mit dreifachem Waschen in TBS-T
- Der Sekundärantikörper (ECL-anti-mouse 1 : 5000) für eine Stunde der Membran hinzufügen
- Dreifaches Waschen der Membran in TBS-T
- Hinzugabe von Detection Reagent (1:1 Detection Reagent 1 und 2)
- Proteine können nun in dem *Molekular Imager ChemiDoc™ XRS* mit der *Image Lab™ Software* sichtbar gemacht werden
- Ladekontrolle mit β -Aktin (1 : 5000)
 - Inkubation über Nacht bei 4 °C in β -Aktin 1 : 5000 in 5 % BSA, gelöst in TBS-T
 - Entfernung unspezifisch gebundene Antikörper mit dreifachem Waschen in TBS-T
 - Sekundärantikörper (ECL-anti-mouse 1 : 5000 in 2,5 % Milch-TBST) für eine Stunde der Membran hinzufügen
 - Dreifaches Waschen der Membran in TBS-T
 - Hinzugabe von Detection Reagent
 - Proteine können in dem *Molekular Imager ChemiDoc™ XRS* mit der *Image Lab™ Software* sichtbar gemacht werden
- Analyse mit dem Programm ImageJ 1.53e, *National Institutes of Health, USA*

Statistik:

Ein Vergleich zwischen den Western-Blots kann über die Normalisierung der Daten zu der Ladekontrolle erreicht werden. Die Quantifizierung sieht zusätzlich den Abzug von Hintergrundsignalen vor.

3.1.2.3. Kalzium-Bildgebung

Grundlagen der Kalzium-Bildgebung:

Die Kalziumkonzentration in den Zellen kann mittels Fura-2 AM, in Form einer ratiometrischen Bildgebungsmikroskopie, gemessen werden. Dieses Verfahren wurde bereits 1985 von Grynkiewicz et al. veröffentlicht (112). Fura-2 AM ist ein Salizylaldehydderivat und kann in veresterter Form gut in die Zellen diffundieren. In den Zellen werden die Estergruppen durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert. Der Farbstoff kann so nicht mehr aus der Zelle diffundieren. Fura-2 fungiert als kalziumsensitiver Fluoreszenzindikator. Bei der Bindung von Fura-2 mit Kalzium kommt es zu einer Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge von 380 nm auf 340 nm (113). Durch das

Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (R) bei einer Emission von 510 nm kann dann die intrazelluläre Kalziumkonzentration ermittelt werden.

Formel 10

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \times \left(\frac{I_{380,f}}{I_{380,b}} \right) [mmol/l]$$

((112))

$[Ca^{2+}]$ = intrazelluläre Kalziumkonzentration

K_d = Dissoziationskonstante von Fura-2 und Kalzium

R_{min} = 0,13

R_{max} = 9,722

$I_{380,f}$ = Fluoreszenzintensität des kalziumfreien Fura-2 bei 380 nm

$I_{380,b}$ = Fluoreszenzintensität des kalziumgebundenem Fura-2 bei 380 nm

Formel 11

$$\left(\frac{I_{380,f}}{I_{380,b}} \right) = \beta = 16,47$$

Formel 12

$$K_d = \frac{c_f \times [Ca^{2+}]}{c_b} = 264$$

Die Zahlenwerte für β , K_d , R_{min} und R_{max} wurden von dem Gastlabor experimentell ermittelt.

Nach Integration der Konstanten K_d , $\left(\frac{I_{380,f}}{I_{380,b}} \right)$, R_{min} , sowie R_{max} sieht der Term folgendermaßen aus:

Formel 13

$$[Ca^{2+}] = 264 \times \left(\frac{R - 0,13}{9,722 - R} \right) \times 16,47 [mmol/l]$$

Praktische Anwendung:

- Fura-2 AM wird in einer 5 μ M Konzentration hergestellt und den Zellen hinzugefügt
- Inkubation der Zellen bei 38 °C für 10 Minuten

- Als Versuchslösungen wird vorbereitet:
 1. HEPES-Lösung
 2. HEPES - 14,15-EET-Lösung (1 μ M)
- Waschen der Zellen mit HEPES
- Glasplatte mit den glatten Muskelzellen in einem für das Mikroskop angepassten Visier-ring fixieren
- Hinzugabe von HEPES um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern
- Mikroskopierbereich mit Zellen auswählen und einzelnen Zellen nummerieren
- Behandlung der Zellen mit den Versuchslösungen, jeweils im Wechsel zu einem Waschschrift mit HEPES

Statistik:

Die maximale intrazelluläre Kalziumkonzentration wird für jede markierte Zelle bestimmt und in einem Box-Plot graphisch dargestellt. Es folgt ein Vergleich des Medians der basalen Kalziumkonzentrationen und den maximalen Kalziumkonzentrationen, die sich auf Zugabe von 14,15-EET als sog. „Peak“ ausbilden.

3.2. Material

3.2.1. Zellen

Tabelle 3: Material - Zellen

Material	Hersteller	Referenznummer
Humane vaskuläre glatte Muskelzellen der Koronararterie (CASMC)	Lonza	CC-2583 Lot: 0000317155

3.2.2. Zellkultur

Tabelle 4: Material - Zellkultur

Material	Hersteller	Referenznummer
Inkubator	Thermo Scientific	BBD 6220
Hämacytometer	BIO-Rad	Tc20 Automated Cell counter
Kulturflaschen	Cellstar	658175
Basalmedium	Lonza	CC-3181
Growth Medium-2 Single Quots™ Supplements and Growth Factors Kit	Lonza	CC-4149
ReagentPack	Lonza	CC-5034
Trypsin/EDTA	Lonza	CC-5012
HEPES	Lonza	50-5022
TNS (<i>Trypsin neutralizing solution</i>)	Lonza	CC-5002
DPBS	Gibco by life technologies	14190-094
6-well plates	Cellstar, Greiner bio-one	657 160
10cm dish	SARSTEDT TC-Schale 100, Standard	83.3902
Eplerenon 10mg (2 mM in DMSO gelöst)	Tocris	2397
Aldosteron 25mg (2 mM in DMSO gelöst)	Sigma Aldrich	A9477-25MG
DMSO	Sigma Aldrich	D8418-100ML
PDGF-BB	Thermo Fischer, Gibco	PH0044
Hydrocortison	Sigma Aldrich	H0888-1b
14,15-EET	Cayman	50651
14,15-Epoxyeicosa-5(Z)-enoic Acid	Cayman	10004946
Mifepriston (RU-486)	Thermofisher-invitrogen	H110-01

3.2.3. RNA-Extraktion

Tabelle 5: Material - RNA-Extraktion

Material	Hersteller	Referenznummer
DPBS	Gibco by life technologies	14190-094
Cell-Scraper	SARSTEDT Zellschaber 25cm	83.1830
Zentrifuge kleine	Eppendorf Centrifuge	5424
Nano Drop	PeqLab Nanodrop 1000	
Maxwell-Kit	Maxwell 16, Ref.	AS1280
Proteinase K	Thermofisher	EO 0492 (Stocklösung 0,25mg/ml)

3.2.4. Reverse Transkriptase

Tabelle 6: Material - Reverse Transkriptase

Material	Hersteller	Referenznummer
GoScript Reaction Buffer, Oligo(dT)	Promega	A2791
Go Script Enzyme Mix	Promega	A5003
Thermo Cycler	PeQLab	

3.2.5. qPCR

Tabelle 7: Material - PCR

Material	Hersteller	Referenznummer
ITaq universal super probes mix	Bio-Rad	172-5134
96-well-Platten	Applied biosystems	4346907
Cover	Applied biosystems	4360954
NFW (Nukleasefreies Wasser)	Promega	
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge	5804
Quant Studio 5 Real time PCR system	Applied biosystems, Thermo Fischer	

3.2.6. Proteinbehandlung und Western-Blot

Tabelle 8: Material - Protein/Western-Blot

Material	Hersteller	Referenznummer
DPBS	Gibco by life technologies	14190-094
RIPA	ThermoFisher Scientific	89900
Proteinase Inhibitor Cocktail Tabletten	cOmplete Tablets Easypack von Roche	04693116001
Zellschaber	SARSTEDT	83.1830
Zentrifuge klein	Eppendorf Centrifuge	5424
BCA	Thermo scientific Protein Assay Kit	23227, LOT 23227
Albumin Standard	ThermoFisher Scientific	23209, LOT SL258420
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A REF	ThermoFisher Scientific	23228, LOT SI255195
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent B	ThermoFisher Scientific	1859079
96-well Plates	ThermoFisher Scientific	
Laborschüttler	KA Labortechnik	KS 125 basic
37°C Inkubator	Haraeus Function line	
Lämmli-Puffer	Bio Rad	161-0737
β-Mercaptoethanol	Promega	Z559A
Thermo Mixer	Eppendorf Thermomixer compact	
MINI-Protean® TGX	Bio Rad	456-1043
Elektrophorese Kammer	Mini Protean Tetra Cell	
TBST-Puffer (Tris buffered saline with Tween)	Eigenherstellung: 100 ml TBS (10 fold), 900 ml H ₂ O, 1 ml Tween 20	
TBS (10 fold)	12,1g Tris HCL (Tris –Hdrochlorid > 99,9% p.A. Roth Nr.9090.2) + 80,23g NaCl (Sodium Chloride Sigma Nr:53014-1kg) auf 1Liter (ph=8)	
Tween 20	Sigma-Aldrich	P2287
Milch-Pulver, Blotting grade, pulv. fettarm	Roth	T145.2
Trans-Blot Turbo	Bio Rad	
Transfer Stacks	Bio Rad	L002043A
PVDF-Membran	Bio Rad	L002045A
Molekular Imager ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software	Bio Rad	
Rabbit Anti-KCNMA1	Alomone	APC-107
ECL Anti-Rabbit	GE Healthcare	NA9340V
Mouse Anti-β-Actin Monoclonal Anti Mouse clone AC-15	Sigma-Aldrich	A5441
ECL Anti-mouse monoklonal IgG HRP linked whole	Amersham	NA931V
Detection Reagent 1	GE Healthcare	Detection Reagenz1 62,5 ml

Detection Reagent 2	GE Healthcare	Detection Reagenz2 62,5 ml
----------------------------	---------------	----------------------------

3.2.7. Kalzium-Bildgebung

Tabelle 9: Materialauflistung - Kalzium-Bildgebung

Material	Hersteller	Referenznummer
24mm Deckgläser	neoLab Stärke I, 24 mm Ø	1-6290
Inkubator	Heraeus cell	
Phenylephrin	Tocris	2838
HEPES	Eigenherstellung: 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1 mM MgCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glukose, 2 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, pH auf 7,4 mit Na OH, Sterilfilter: 0,2 µm	
BSA	Sigma	A3803-100G
14,15-EET	Cayman	50651
Benutzerschnittstelle	TILL-Vision, TILL Photonics	
Mikroskop	Olympus, 20 fach-Objektiv, ausgerüstet mit einem Polychrom 5 Monochromator	IX71
Fura-2, AM	Invitrogen by Thermo Fisher	F1201

4. Ergebnisse

4.1. Bestimmung der Referenzgene für die RT-qPCR

Tabelle 10: Ergebnis Referenzgene RT-qPCR Runde 1 und 2, dargestellt als Stabilitätswert (über die Software Normfinder ermittelt)

Gene	Stabilitäts-Wert
EIF2B1	0,076
ELF1	0,190
PPIA	0,079
HPRT1	0,103
YWHAZ	0,103
GAPDH	0,048

Die im Experiment gewonnene cDNA wurde in Triplikaten auf alle sechs Referenzgene getestet. EIF2B1 und PPIA haben niedrige und nah beieinander liegende Werte von 0,076 und 0,079 und wurden als Referenzgene ausgewählt. Ab dem dritten RT-qPCR-Durchgang wurde F dem Medium zugegeben. Wegen dieser neuen Behandlungsart wurden auch die Stabilität der Referenzgene neu bestimmt.

Tabelle 11: Ergebnis der Bewertung der Referenzgene Runde 3 – 5, ausgedrückt als Stabilitätswert nach Normfinder

Gen	Stabilitäts-Wert
EIF2B1	0,364
ELF1	0,259
PPIA	0,011
HPRT1	0,043
YWHAZ	0,455
GAPDH	0,011

Die Gene PPIA und GAPDH zeigten beide den kleinsten Stabilitätswert von 0,011 und wurden für alle darauffolgenden Experimente verwendet.

4.2. RT-qPCR Ergebnisse

4.2.1. Gliederung der Ergebnisdarstellung

1. Marker des Phänotypen-Switch:

- Glattmuskuläres α -Aktin Typ 2: ACTA2
- Glattmuskuläre schwere Kette von Myosin: MYH11
- Proliferationsmarker ki-67: MKI67
- Osteopontin: SPP1
- α -Untereinheit des spannungsabhängigen Kalziumkanals: CACNA1C

2. Strukturen für transkriptionelle Marker der MR vermittelten Signaltransduktion:

- 11β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 und 2: HSD11B1 und HSD11B2
- α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals: SCNN1A
- Mineralokortikoidrezeptor: NR3C2
- Angiotensin II Rezeptor Typ 1: AGTR1

3. Signalkaskade der EETs:

- Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie: TRPV4
- Porenbildende Untereinheit des BK_{Ca} -Kanals: KCNMA1
- Membrangebundene und lösliche Epoxidhydrolase: EPHX 1 und EPHX 2

4.2.2. Übersicht

Tabelle 12: Darstellung der zeitlichen Entwicklung des RT-qPCR Experimentdesigns und der damit verbundenen Fragestellung. Zusätzlich eine kurze Skizzierung der Ergebnisse. A = Aldosteron; Ctrl. = Kontrolle; Ep = Eplerenon; GR = Glukokortikoidrezeptor; F = Hydrocortison; h = Stunde; MR = Mineralokortikoidrezeptor; sEH = lösliche Epoxidhydrolase; SmBM = smooth muscle basal medium; SmGM = smooth muscle growth medium; EET = Epoxyeicosatriensäure; PDGF-BB= Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); RU486 = Mifepriston; tend. = tendenziell; sig. = signifikant.

Durchgang	Gene	Behandlungsart	Behandlungsdauer	Fragestellung	Ergebnis
1	ACTA2 MKI67 SPP1 TRPV4	Kontrolle und Behandlungsmedien mit SmGM <ul style="list-style-type: none"> • 100 nM A/+ Ep • 10 nM A/+ Ep 	3 x 24 h	Welchen Effekt hatte A und konnte dieser mit Ep antagonisiert werden?	Es wurden keine signifikanten aldosteronvermittelten Effekte aufgedeckt.
2	ACTA2 MKI67 SPP1 SCNN1A NR3C2 TRPV4 KCNMA1	Wechsel zu serumfreiem Medium 10 h vor der Behandlung. Ctrl. und Behandlungsmedien mit SmBM. <ul style="list-style-type: none"> • 100 nM A/+ Ep • 10 nM A/+ Ep 	3 x 48 h	Können Unterschiede in der Expression einem zeitlichen Faktor zugeordnet werden? Welchen Effekt hatte A und konnte dieser mit Ep antagonisiert werden?	ACTA2: 48 h > 24 h MKI67: keine Effekte SPP1: keine Effekte SCNN1A: keine Effekte NR3C2: keine Effekte TRPV4: keine Effekte KCNMA1: 10 nM A > 10 nM A + Ep Aber: Zeitliche Effekte können wegen gleichzeitiger Änderung der Vorbehandlung nicht eindeutig bewertet werden.
3	ACTA2 MYH11 MKI67 SPP1 CACNA1C HSD11B1 HSD11B2 SCNN1A NR3C2 AGTR1 TRPV4 KCNMA1 EPHX1 EPHX2	Behandlung mit: <ul style="list-style-type: none"> • 1 nM A • Ep • Neu: F 	3 x 24 h 3 x 48 h	Wie verhält sich die Zelle mit der Co-Stimulation durch F? Sind die Ergebnisse der Aldosteronbehandlung vergleichbar mit der PDGF-BB-Behandlung?	ACTA2: 48 h > 24 h, PDGF-BB vergleichbar MYH11: keine Effekte MKI67: 48h PDGF-BB > alle weiteren Behandlungen SPP1: keine Effekte CACNA1C: keine Effekte HSD11B1: keine Effekte HD11B2: keine Effekte SCNNA1: keine Effekte

					<p>NR3C2: 48 h > 24 h, A vermutlich supprimierend</p> <p>AGTR1: nach 48 h F > A+F</p> <p>TRPV4: 48 h > 24 h</p> <p>KCNMA1: 48 h > 24 h; F < DMSO</p> <p>EPHX1: 24 h PDGF-BB < alle weiteren Behandlungen nach 24 h</p> <p>EPHX2: 48 h > 24 h (bei PDGF-BB)</p>
4	MYH11 SCNN1A KCNMA1	<p>Behandlung mit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 nM A • Ep • F • Neu: RU486 	3 x 48 h	Sind die Effekte MR- oder GR-vermittelt?	<p>MYH11: keine Effekte</p> <p>SCNN1A: keine Effekte</p> <p>KCNMA1: F: RU486 > Ep;</p> <p>F + A : Ep + RU486 > Ep oder RU486</p>
5	MYH11 SPP1 KCNMA1	<p>Behandlung mit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 nM A • Ep • F • Neu: 14,15-EET 1 µM und 14,15-EE-5(Z)-E 10 µM 	3 x 48 h	<p>Welche Effekte sind zu sehen, wenn EETs zusätzlich zu A und F der Zelle zur Verfügung stehen?</p> <p>Können die Ergebnisse von Runde 3 bestätigt werden?</p>	<p>MYH11: keine Effekte</p> <p>SPP1: EET-Antagonisierung -> Zunahme der Expression</p> <p>KCNMA1: EETs und A reduzieren KCNMA1-Expression</p>

4.2.2.1. Marker des Phänotypen-Switch

4.2.2.1.1. Glattmuskuläres α -Aktin Typ 2 - ACTA2

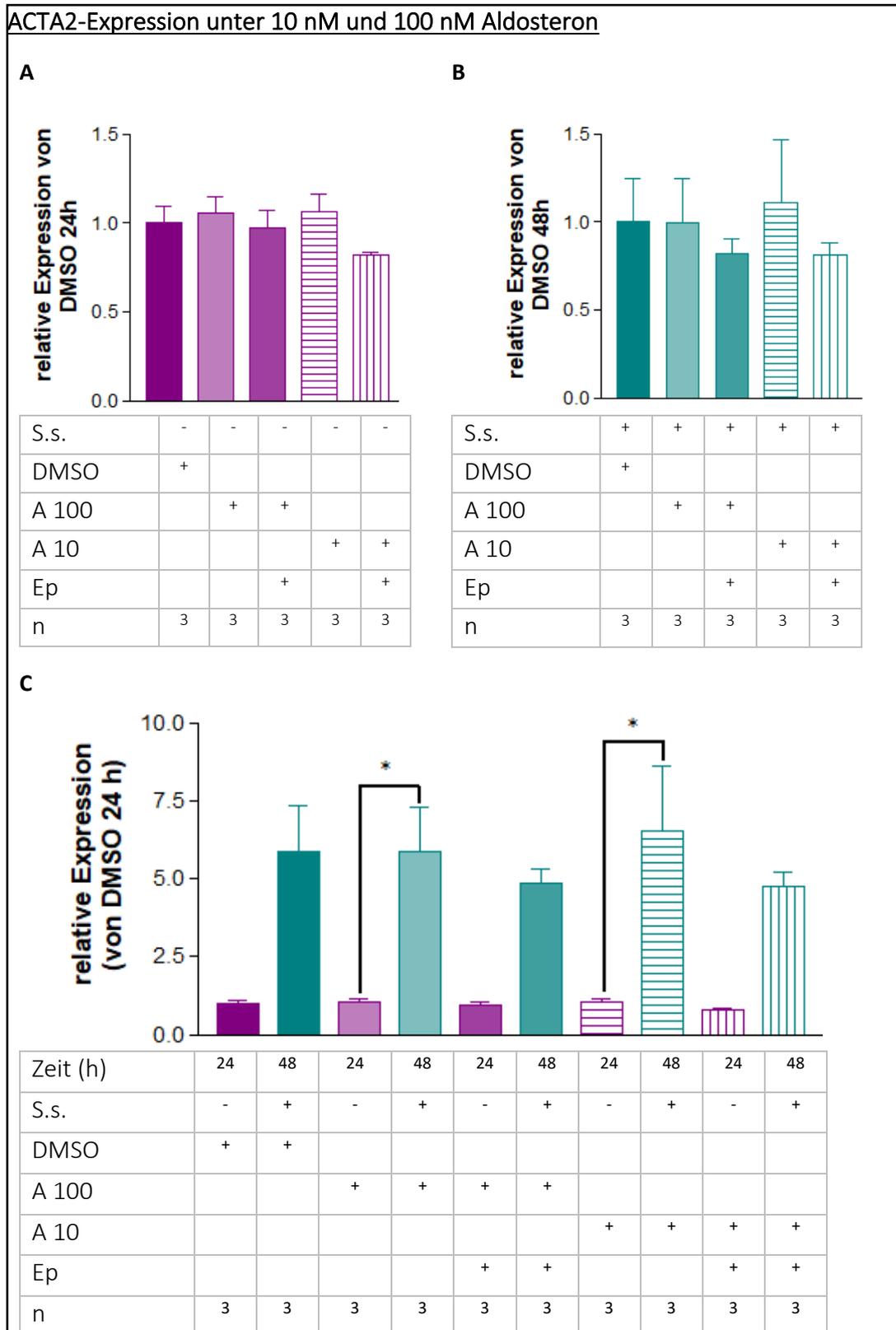


Abbildung 4: ACTA2-Expression unter 10 nM und 100 nM Aldosteron nach 24 h (A) nach 48 h (B) und einen Vergleich beider Zeiten (C). Eine Serum starvation (S.s.) fand nur bei der 48-stündigen Behandlung statt. Die Ergebnisse sind

normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: EIF2B1 und PPIA und dargestellt in relativer Expression zum Mittelwert der jeweiligen Kontrollbehandlung (Ctr. = DMSO) und zum Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 24 h (Ctr. = DMSO) bei Abb. C. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikante Unterschiede innerhalb der Darstellung der einzelnen Behandlungszeiten (A,B). Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den 24-stündigen Behandlungen und der Verdopplung der Behandlungszeit unter A 100 und A 10 (* = $p < 0,05$) (C). Signifikanz getestet mit One-way ANOVA und dem post-hoc Test nach Tukey. A 100 = Aldosteron (100 nM); A 10 = Aldosteron (10 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); h = Stunden. n = 3.

Innerhalb der jeweiligen Zeitgruppen (A und B) ließ sich kein Unterscheid in der ACTA2-Expression nachweisen.

Bei direktem Vergleich der Behandlungszeiten zeigte die Behandlung mit 100 nM A, sowie die Gruppe mit 10 nM A eine signifikante Expressionssteigerung über die Zeit. Zusätzlich wurde mit der längeren Behandlungszeit eine Serum starvation hinzugenommen. Unter Berücksichtigung der in Abb. 5 dargestellten Ergebnisse, welche unter DMSO eine Verdopplung der Expression bei verdoppelter Behandlungszeit zeigten, können der Serum starvation in Abb. 4 etwa eine 2 bis 3-fache Expressionssteigerung zugerechnet werden. Wegen der gleichzeitigen Änderung von Behandlungszeit und Vorbehandlung kann hier aber keine konkrete Zuordnung der Effekte erfolgen.

Die Ergebnisse deuten auf eine Induktion des kontraktile Phänotyps durch Serum starvation und Verlängerung der Behandlungszeit hin.

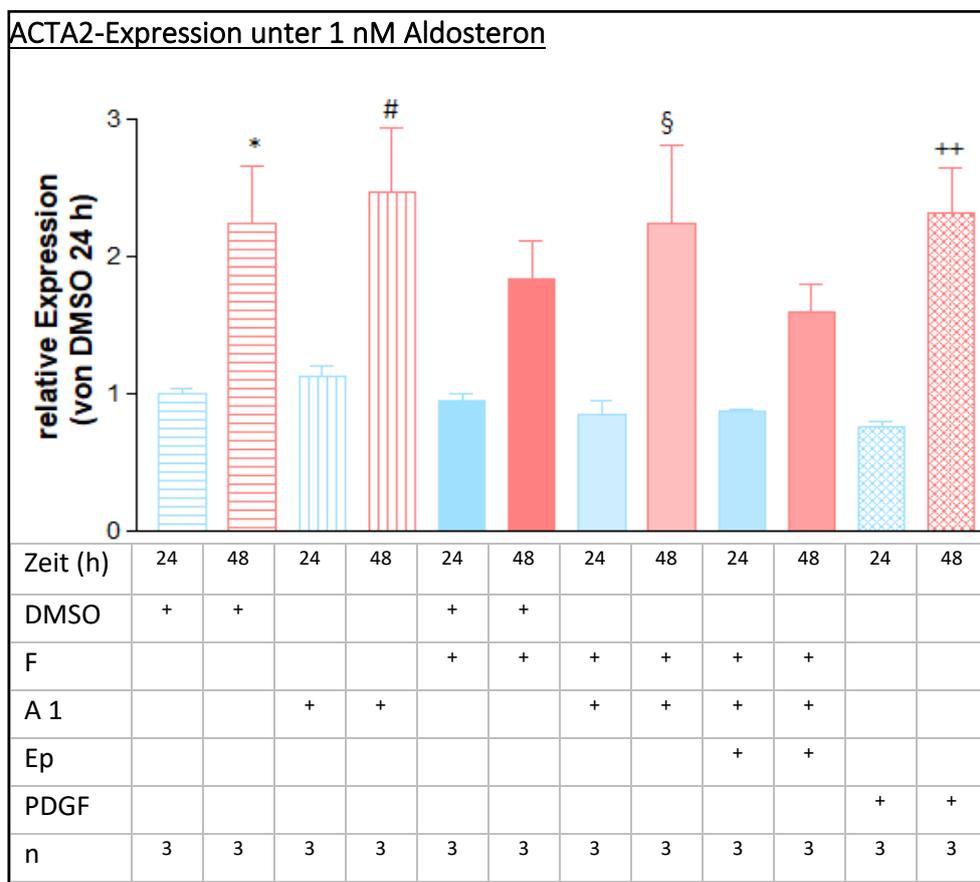


Abbildung 5: ACTA2-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24- und 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der

Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der 24-stündigen Kontrollbehandlung (24h DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungszeiten. Die Expressionen waren nach 48 h signifikant erhöht innerhalb der DMSO-Behandlung (24 h vs 48 h, * = $p < 0,05$), der Aldosteronbehandlung (24 h vs 48 h, # = $p < 0,05$), sowie der Behandlung mit Aldosteron und Hydrocortison (24 h vs 48 h, § = $p < 0,05$) und jener mit PDGF (24 h vs 48 h, ++ = $p < 0,01$). Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA gefolgt von dem post-hoc Test nach Sidak. A 1 = Aldosteron 1 nM; Ep = Eplerenon 2 μ M; F = Hydrocortison 140 nM; PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n = 3.

Bei einer Aldosteronkonzentration von 1 nM und einer einheitlichen Vorbehandlung mittels Serum starvation konnte die längere Behandlungszeit mit einer vermehrten ACTA2-Expression in Verbindung gebracht werden. Die Behandlung mit PDGF-BB zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie die übrigen Behandlungen.

Es fiel zudem auf, dass vor allem die Behandlungen mit A (mit und ohne F) einen statistisch signifikanten Anstieg über die Behandlungszeit zeigten. Es scheint, dass Aldosteron die Zellen empfindlich für die differenzierenden Effekte der längeren Kulturzeit macht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse vermehrt eine Steigerung der ACTA2-Expression bei verlängerter Behandlungsdauer.

4.2.2.1.2. Glattmuskuläre schwere Kette von Myosin - MYH11

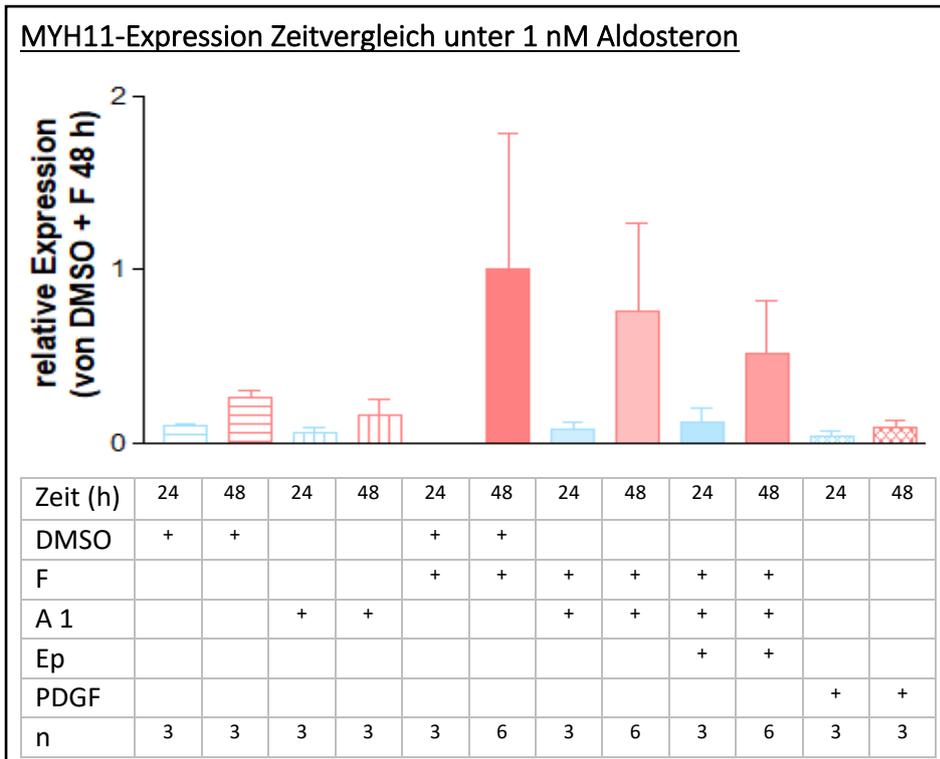


Abbildung 6: MYH11-Expression nach 24- und 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h mit DMSO und F. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen. Getestet innerhalb der Behandlungen (24 h vs. 48 h) mittels One-way ANOVA und dem post-hoc-Test nach Sidak. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); PDGF-BB = Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n = 3

Mit Erhöhung der Stimulationszeit von 24 auf 48 h erhöhte sich die MYH11-Expression nicht statistisch signifikant.

MYH11-Expression nach 48 Stunden mit und ohne Hydrocortison

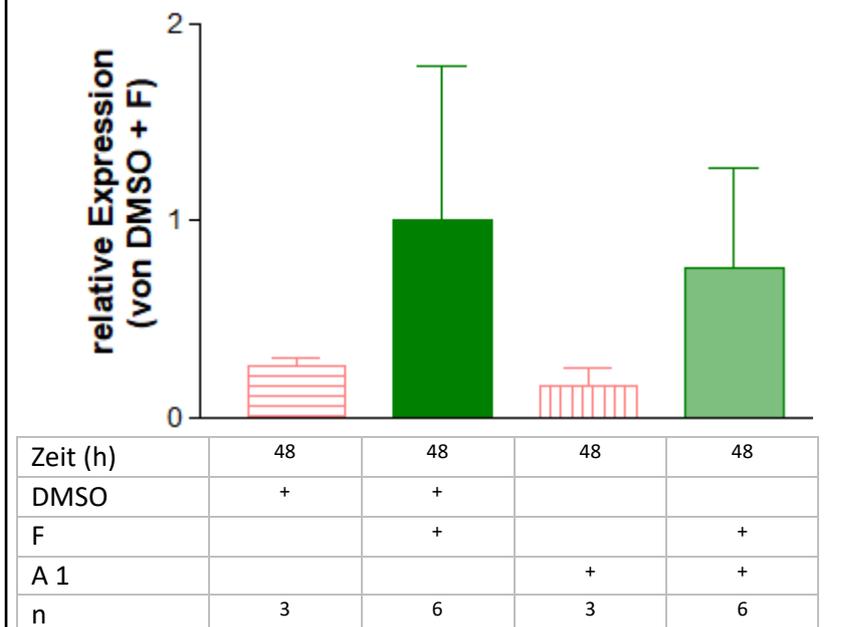


Abbildung 7: MYH11-Expression nach 48 h mit und ohne Hydrocortison. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h mit DMSO und F. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben keine signifikanten Unterschiede. Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M; F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunden. n = 3 und n = 6.

Der Vergleich der 48-stündigen Behandlungen mit und ohne F deutete auf eine Expressionssteigerung unter F hin. Diese Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant.

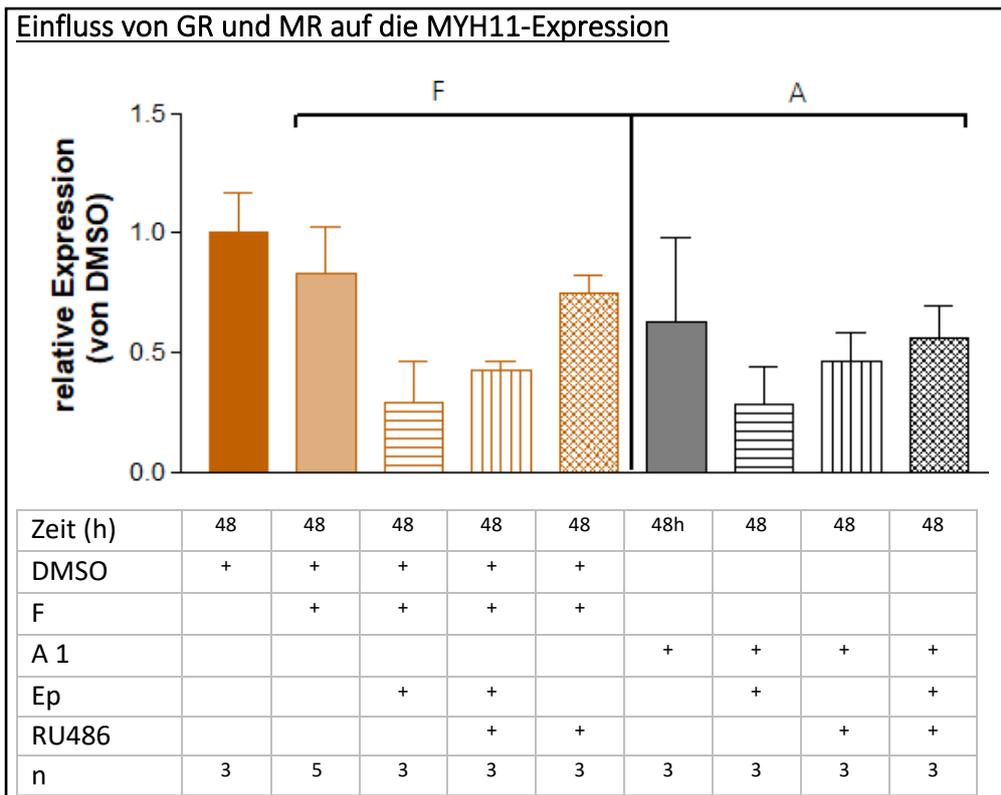
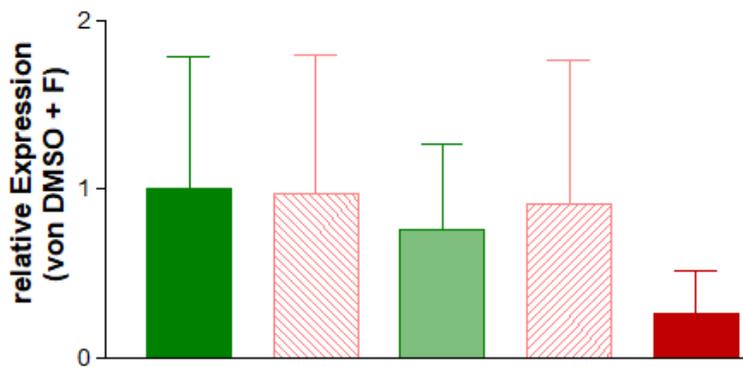


Abbildung 8: Einfluss von GR und MR auf die MYH11-Expression. Gezeigt sind verschiedene Behandlungskombinationen mit den Rezeptor-Antagonisten Ep und RU486 sowie den Stimulantien F und A. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); RU486 = Mifepriston (1 μ M); h = Stunden. n = 3 und n = 6.

Die tendenzielle Expressionssteigerung von MYH11 unter F konnte sowohl bei Zugabe von Eplerenon als auch bei Behandlung mit RU486 aufgehoben werden. Nachdem keine signifikanten Unterschiede detektiert werden konnten, kann nicht davon ausgegangen werden, dass MYH11 unter der transkriptionellen Kontrolle des singularär stimulierten GR oder MR steht.

MYH11-Expression unter 14,15-EET



Zeit (h)	48	48	48	48	48
DMSO	+	+			
F	+	+	+	+	+
A 1			+	+	+
EET		+		+	+
EEZE					+
n	6	3	6	3	3

Abbildung 9: MYH11-Expression unter 14,15-EET bei einer Behandlungsdauer von 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO + F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); EET = 14(15)-EET (1 μ M); EEZE = 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M); h = Stunden. n = 3 und n = 6.

Das Hinzufügen von 14,15-EET zu den jeweiligen Behandlungen zeigte keine signifikante Änderung des Expressionsniveaus von MYH11. Nach gleichzeitiger EET-Antagonisierung durch das strukturelle 14,15-EET-Analogon 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M) war die Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen tendenziell am geringsten. Die Stimulation mit EET hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die MYH11-Expression und zeigte keine Interaktion mit einer Aldosteronbehandlung.

4.2.2.1.3. Der Proliferationsmarker - MKI67

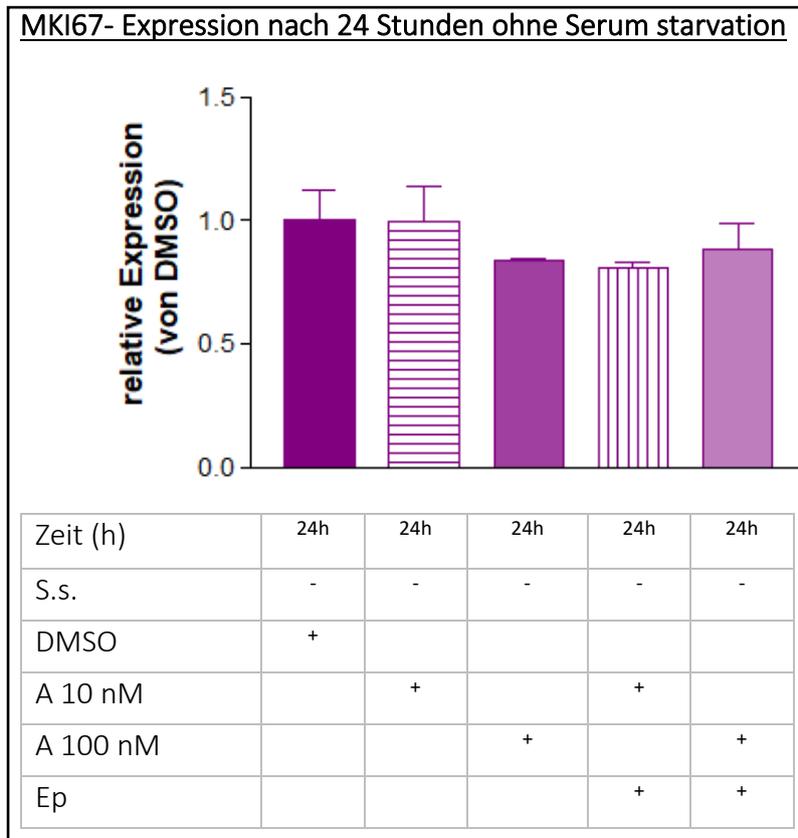


Abbildung 10: Gegenüberstellung der Expression von MKI67 nach 24 h Behandlung, ohne vorangegangene Serum starvation. Die Ergebnisse sind jeweils normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: EIF2B1 und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der jeweiligen Kontrollbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA. A 100 = Aldosteron (100 nM); A 10 = Aldosteron (10 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M), h = Stunden. n = 3.

Die Proliferation, gemessen an der MKI67-Expression (codiertes Protein: Antigen ki-67), zeigte nach 24 h unter 10 nM und 100 nM Aldosteron keine signifikanten Expressionsveränderungen.

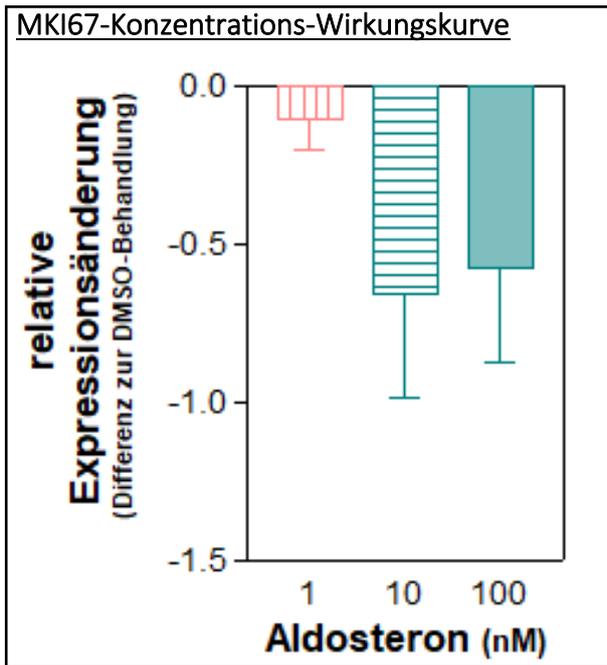


Abbildung 11: MKI67-Expression, dargestellt in einer Konzentrations-Wirkungskurve mit 1 nM, 10 nM und 100 nM Aldosteron im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollbehandlung mit DMSO (äquivalente DMSO-Volumenkonzentration zur jeweiligen Aldosteronkonzentration). Die Behandlung erfolgte jeweils für 48 h. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Signifikanz getestet mittels One-way-ANOVA. n = 3.

Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigte die geringsten Expressionswerte unter 10 nM Aldosteron. Es besteht Grund zur Annahme, dass die Expressionswerte ab 10 nM Aldosteron ein Plateau erreichten. Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

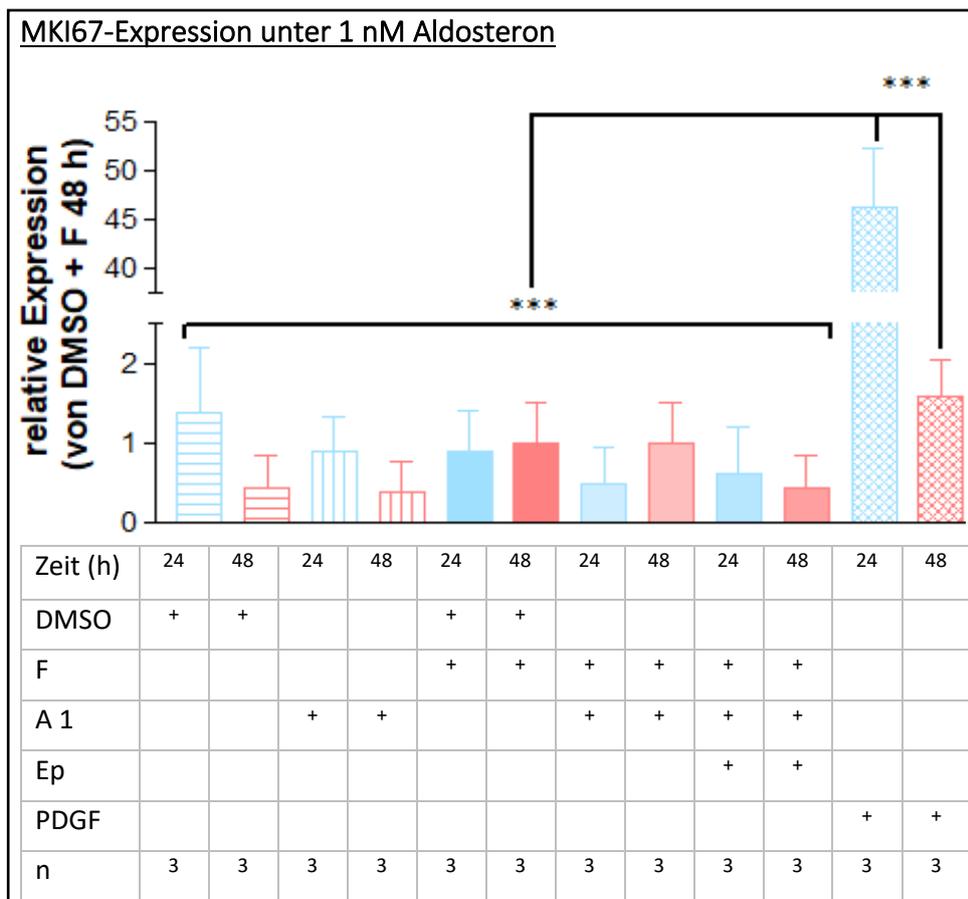


Abbildung 12: MKI67-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24 und 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: PPIA und GAPDH und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO + F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Expression von MKI67 war unter PDGF-BB nach 24 h signifikant gegenüber allen anderen Behandlungen erhöht. *** = $p < 0,001$. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA, gefolgt von dem post-hoc Test nach Tukey. A = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); PDGF-BB = Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n=3.

Verglichen mit einer Positivkontrolle für die Induktion von Proliferation (PDGF-BB) hatte die Behandlung mit Aldosteron insgesamt keinen proliferationsfördernden Einfluss auf die VSMC. Eine 24-stündige Stimulation mit PDGF-BB steigerte die MKI67-Expression um den Faktor 46,2. Hier bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zu allen anderen 24-h-Behandlungen. Der Effekt reduzierte sich nach weiteren 24 h Behandlungszeit auf eine lediglich 1,5-fache Expressionszunahme gegenüber der Kontrollbehandlung mit Hydrocortison.

4.2.2.1.4. Osteopontin - SPP1

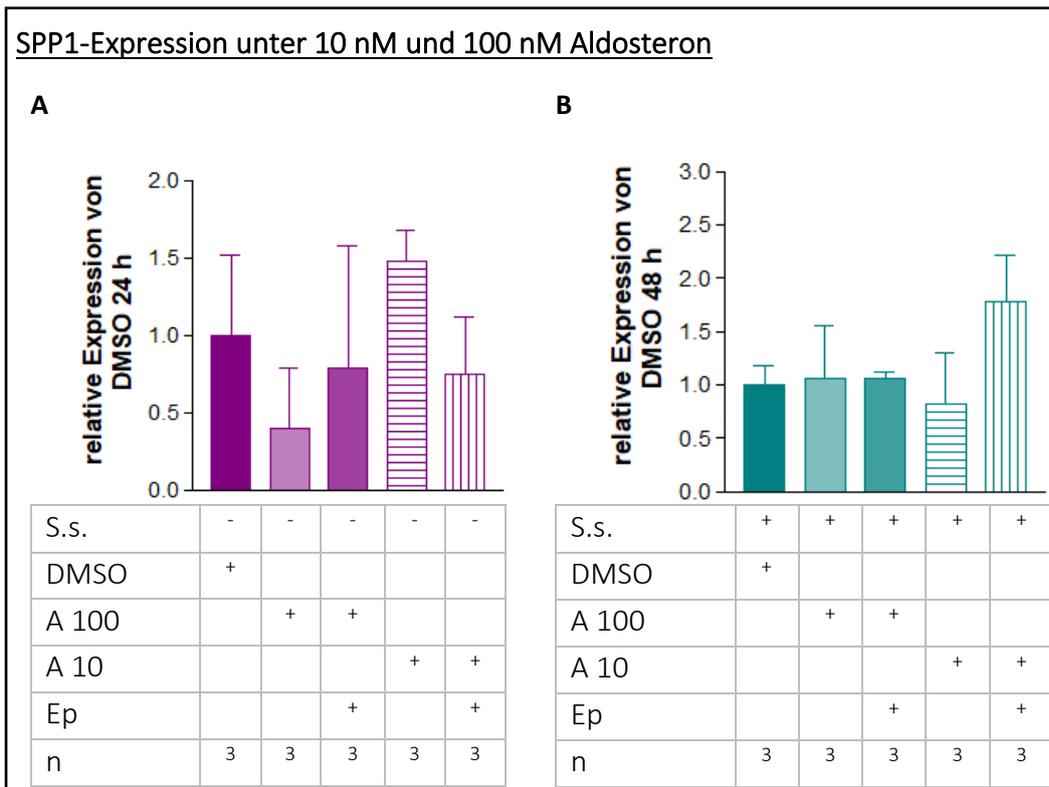


Abbildung 13: SPP1- Expression unter 10 nM und 100 nM Aldosteron nach 24 h (A) nach 48 h (B). Eine Serum starvation fand nur bei der 48-stündigen Behandlung statt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: EIF2B1 und PPIA und dargestellt in relativer Expression zum Mittelwert der jeweiligen Kontrollbehandlung (Ctr. = DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A 100 = Aldosteron (100 nM); A 10 = Aldosteron (10 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); h = Stunden. n = 3.

Die SPP1-Expression wurde als Marker des synthetischen VSMC-Phänotyps untersucht. Die Untersuchungen mit 10 nM und 100nM Aldosteron nach 24 und 48 h zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede zur jeweiligen Kontrollbehandlung (DMSO).

SPP1-Expression unter 1 nM Aldosteron

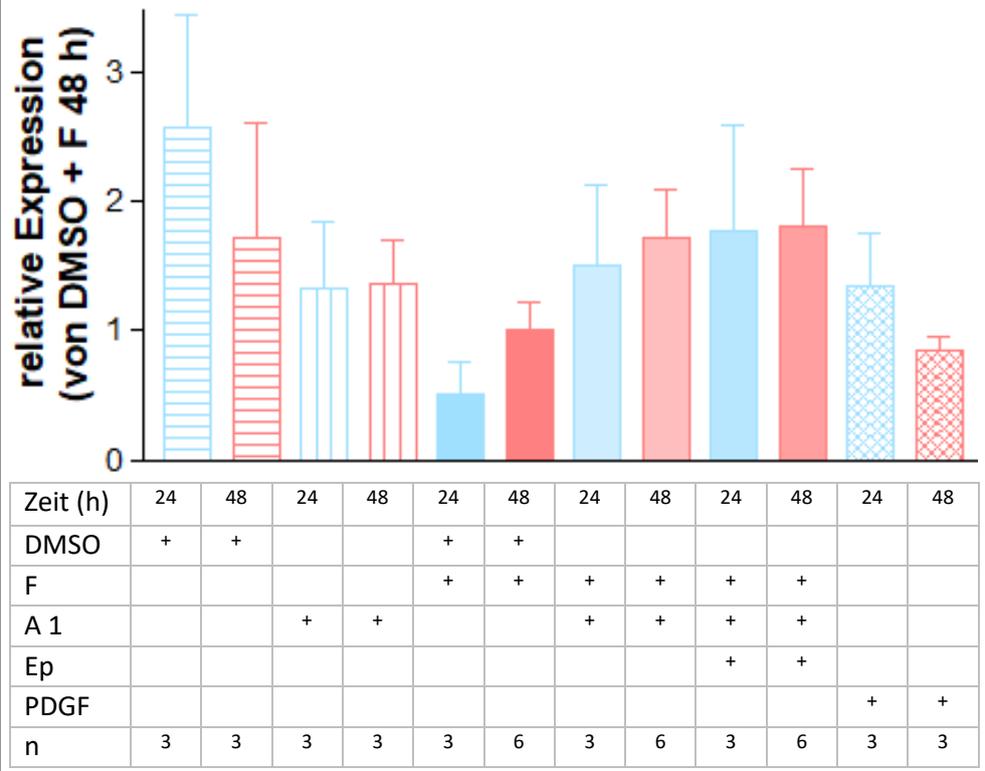


Abbildung 14: SPP1-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24 und 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: PPIA und GAPDH und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO + F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunde; PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n = 3.

Das Expressionsverhalten von SPP1 zeigte keine signifikanten Expressionsveränderungen unter 1 nM Aldosteron und es ließen sich zudem keine zeitabhängigen Unterschiede feststellen. Die Stimulation mit PDGF-BB bewirkte ebenfalls keine signifikante Expressionssteigerung von SPP1.

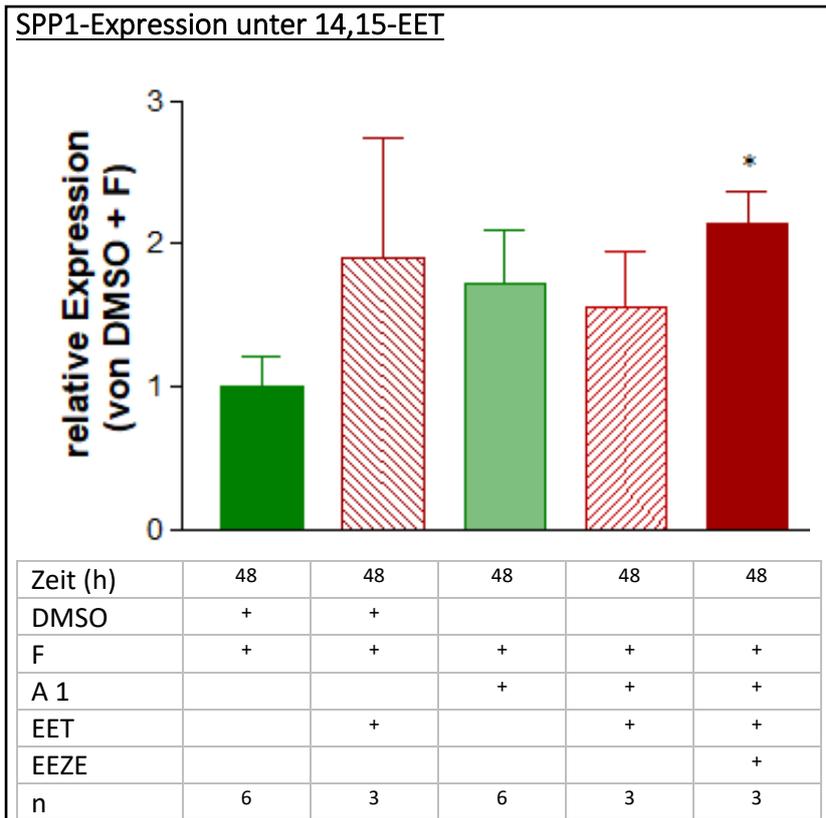


Abbildung 15: SPP1-Expression unter 14,15-EET nach 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serumstarvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO mit F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Im t-Test war die Expression unter F + A1 + EET + EEZE gegenüber der DMSO + F-Behandlung signifikant erhöht. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); EET, 14,15-EET (1 μ M); EEZE = 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M), h = Stunden. n = 6 und

Die Stimulation mit 1 μ M 14,15-EET und 1 nM Aldosteron ergab keine Unterschiede in der SPP1-Expression zu der Behandlung mit Aldosteron und Hydrocortison. Auch zeigten sich keine signifikanten Effekte von 1 μ M 14,15-EET mit Hydrocortison im Vergleich zu der Behandlung ohne 14,15-EET. Die Hinzunahme des strukturellen Analogons 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M) zu 1 nM Aldosteron und 1 μ M 14,15-EET ergab die höchsten SPP1-Expressionswerte (im t-Test gegen DMSO + F: p = 0,0142). Eine EET-Stimulation hatte demnach keine direkten Auswirkungen auf die SPP1-Expression, eine EET-Antagonisierung ergab jedoch eine Zunahme der SPP-Expression.

4.2.2.1.5. Expression der α -Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanals - CACNA1C

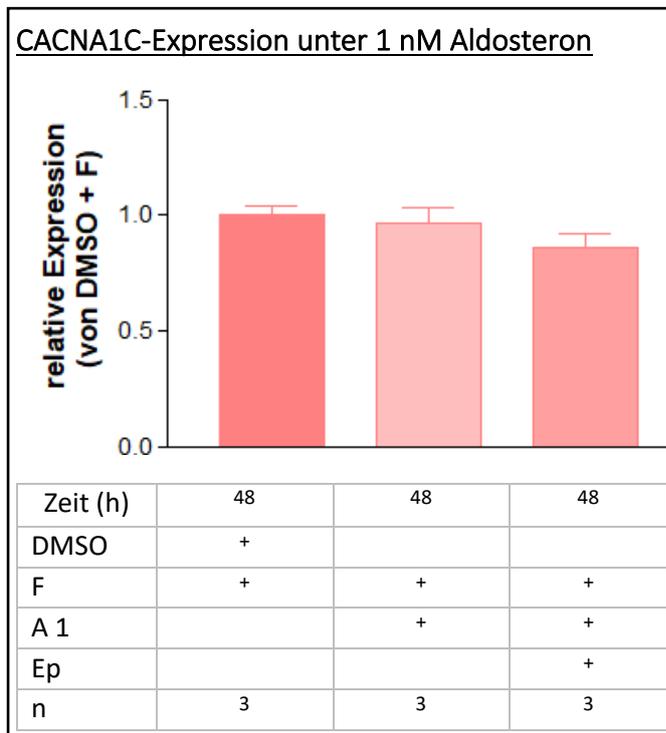


Abbildung 16: CACNA1C-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 48-stündiger Behandlung. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO und F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A1 = Aldosteron 1nM; Ep = Eplerenon 2 μ M; F = Hydrocortison 140nM; h = Stunden. n = 3.

CACNA1C kodiert für die porenbildende Untereinheit des spannungsabhängigen Kalziumkanals CaV1.2. 1 nM Aldosteron hatten im Vergleich zur Kontrollbehandlung keinen Einfluss auf die Expression von CACNA1C. Ebenso führte eine MR-Antagonisierung zu keiner signifikanten Änderung der Expression.

4.2.2.2. Strukturen für transkriptionelle Marker der MR-vermittelten Signaltransduktion

4.2.2.2.1. Die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen 1 und 2 - HSD11B1 und HSD11B2

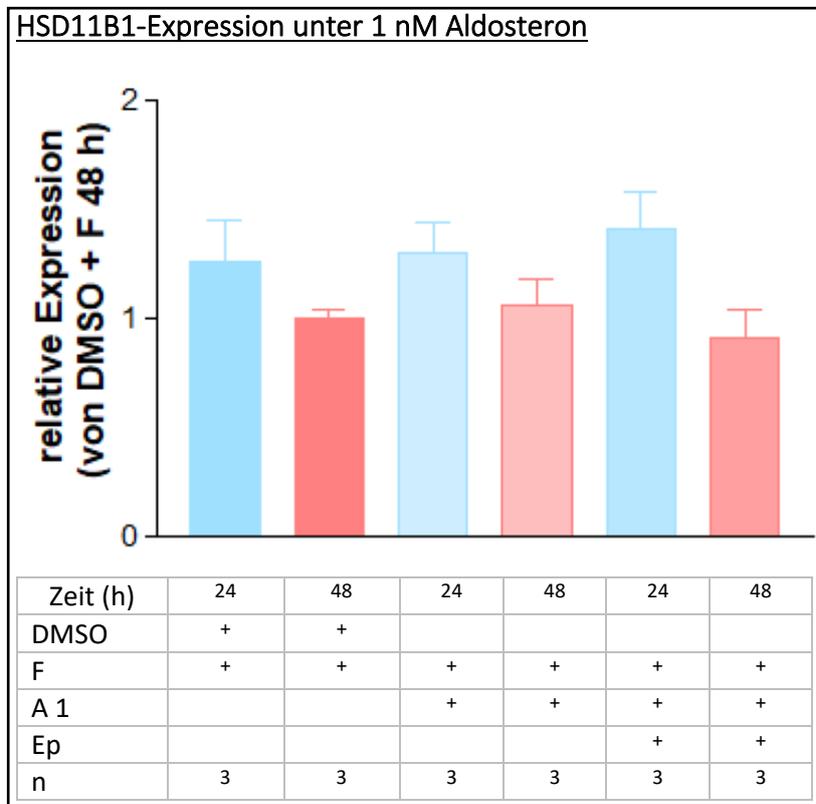


Abbildung 17: HSD11B1-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24- und 48-stündiger Behandlung. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO und F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunden. n = 3.

Die Expression von HSD11B1 war in allen Gruppen gut nachweisbar und unabhängig von der Aldosteron- oder Eplerenonbehandlung stets stabil. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungszeiten und -gruppen festgestellt werden.

HSD11B2-Expression unter 1 nM Aldosteron

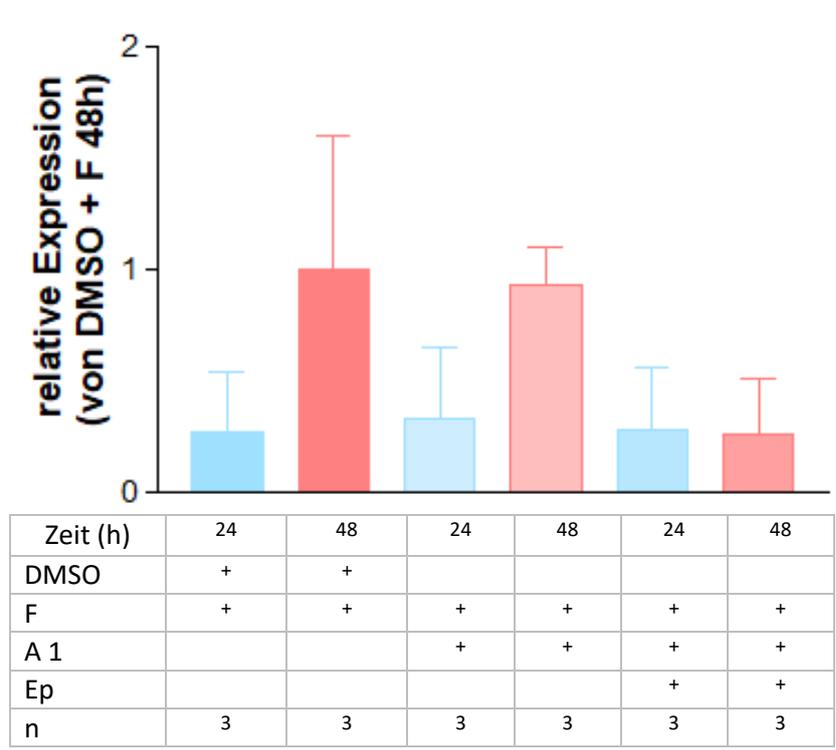


Abbildung 18: HSD11B2-Expression unter 1nM Aldosteron nach 24- und 48-stündiger Behandlung. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA. Dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO und F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunden. n = 3.

HSD11B2 war ebenfalls nachweisbar und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Behandlungsmedien und -zeiten. Im Vergleich zu HSD11B1 war die relative Expression geringer. Dies äußerte sich in Form von höheren C_T -Werten im Vergleich zu HSD11B1 (C_T -Mittelwert für 48 h: 27,6 vs. 33,8).

4.2.2.2.2. Der epitheliale Natriumkanal – SCNN1A

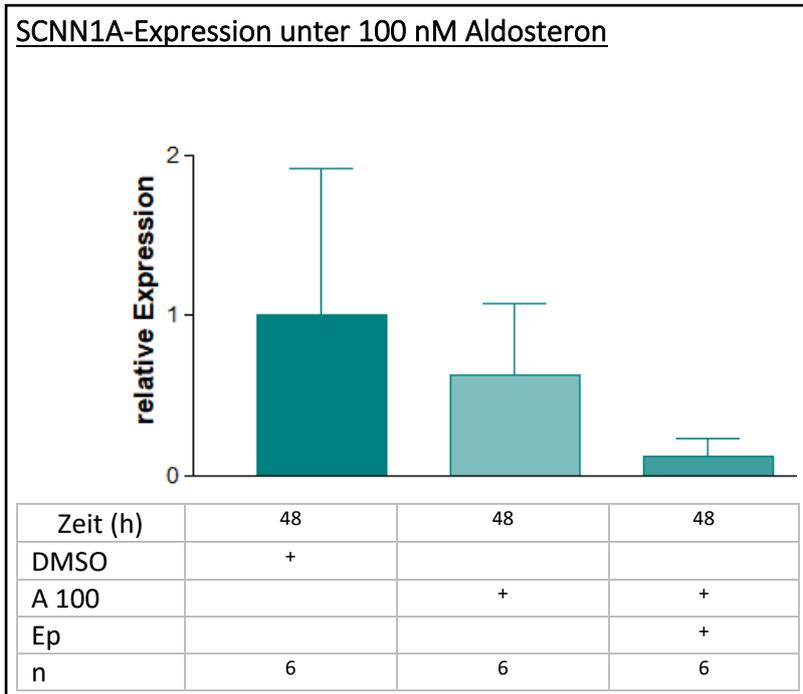


Abbildung 19: SCNN1A-Expression unter 100 nM Aldosteron nach 48 h. Alle Gruppen wurden zuvor mit einer Serumstarvation behandelt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: EIF2B1 und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO + F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Statistisch geprüft mittels One-way ANOVA. A 100 = Aldosteron (100 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); h = Stunden. n = 3.

Nach 48-stündiger Behandlung unter 100 nM Aldosteron zeigten sich bezüglich der SCNN1A-Expression keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollbehandlung und der Behandlung mit Eplerenon.

SCNN1A-Expression unter 1 nM Aldosteron

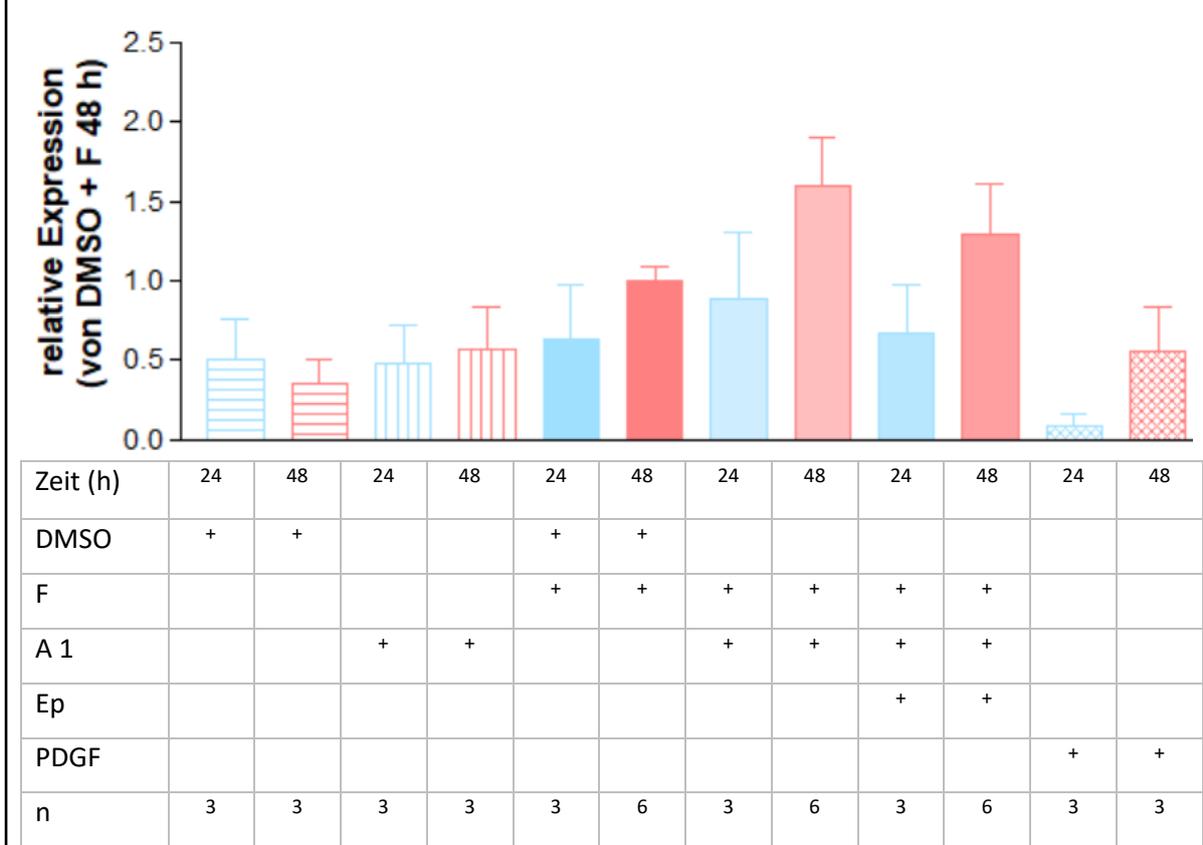


Abbildung 20: SCNN1A-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24- und 48-stündiger Behandlung. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: PPIA und GAPDH und sind dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO +F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunde; PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n = 3, n = 6.

Das Expressionsverhalten von SCNN1A zeigte keine signifikanten Änderungen unter allen dargestellten Behandlungen und Behandlungszeiten. Die Stimulation mit PDGF-BB bewirkte ebenfalls keine signifikante Expressionsänderung.

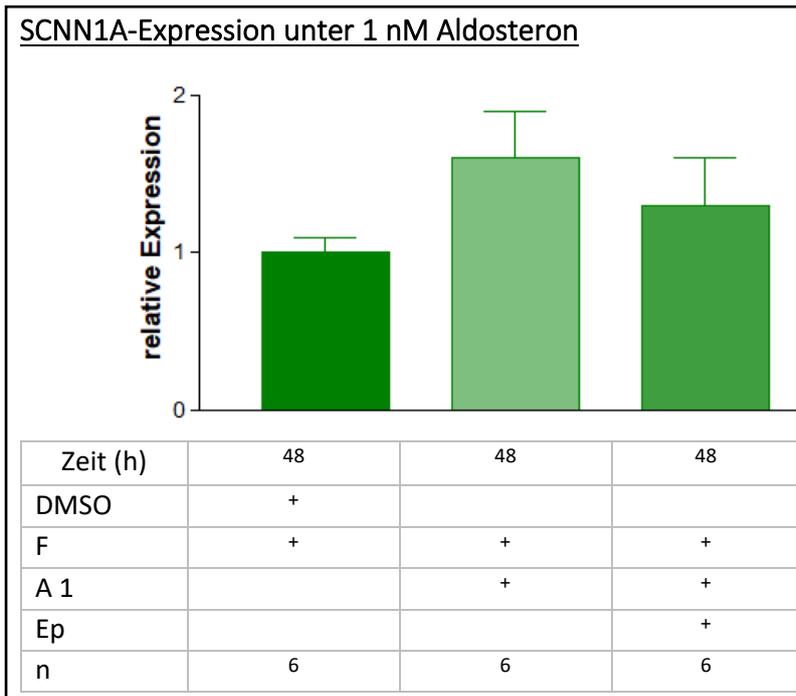


Abbildung 21: SCNN1A-Expression nach 48 h mit verdoppelter Anzahl der Experimente Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO und F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede registrieren. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM) Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunden. n = 6.

Bei isolierter Betrachtung des Effektes von Aldosteron auf dem Hintergrund einer 48-stündigen Hydrocortisonbehandlung konnte eine tendenzielle MR-vermittelte Steigerung der Expression der α -Untereinheit des eNaC beobachtet werden ($p < 0,05$ im t-Test von DMO + Hydrocortison vs. Aldosteron + Hydrocortison). Der Unterschied war jedoch auch bei der limitierten Anzahl an verglichenen Gruppen nicht statistisch signifikant.

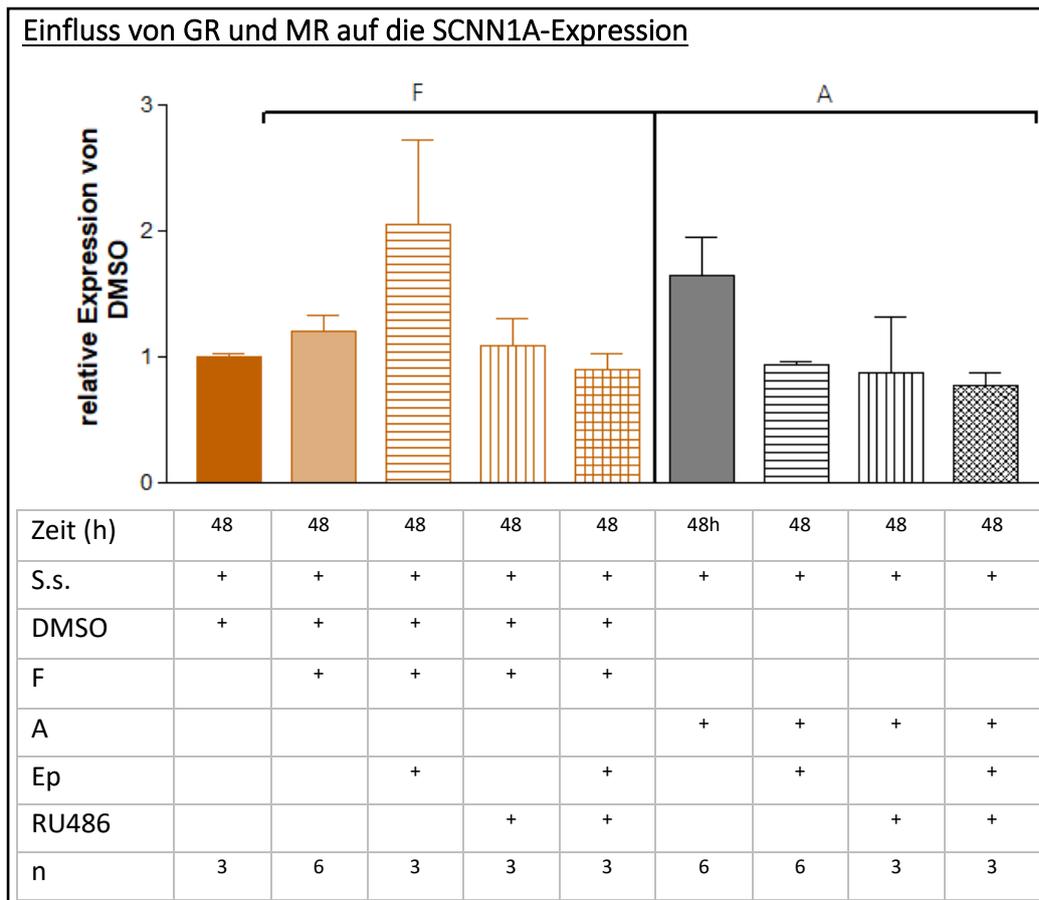


Abbildung 22: Einfluss von GR und MR auf die SCNN1A-Expression. Gezeigt sind verschiedene Behandlungskombinationen mit den Rezeptor-Antagonisten Ep und RU486 sowie simultaner Gluko- oder Mineralokortikoidapplikation. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede registrieren. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunden; RU486 = Mifepriston (1 μ M). n = 3 und n = 6.

Die Behandlung mit Eplerenon und Hydrocortison hatte im Vergleich zu der alleinigen Behandlung mit Hydrocortison keinen supprimierenden Effekt auf die SCNN1A-Expression. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Expression unter Zugabe von Mifepriston wieder nahe der Kontrollbehandlung. Auch die tendenzielle Expressionssteigerung unter der Aldosteronbehandlung wurde durch Mifepriston wieder auf das Level der Kontrollbehandlung gebracht. Die Wirkung von Mifepriston legt nahe, dass die Antagonisierung des GR einen Einfluss auf die SCNN1A-Expression hat.

Nachdem aber keine signifikanten Unterschiede detektiert werden konnten, kann unter den untersuchten Bedingungen nicht davon ausgegangen werden, dass SCNN1A in glatten Muskelzellen unter der transkriptionellen Kontrolle von GR oder MR steht.

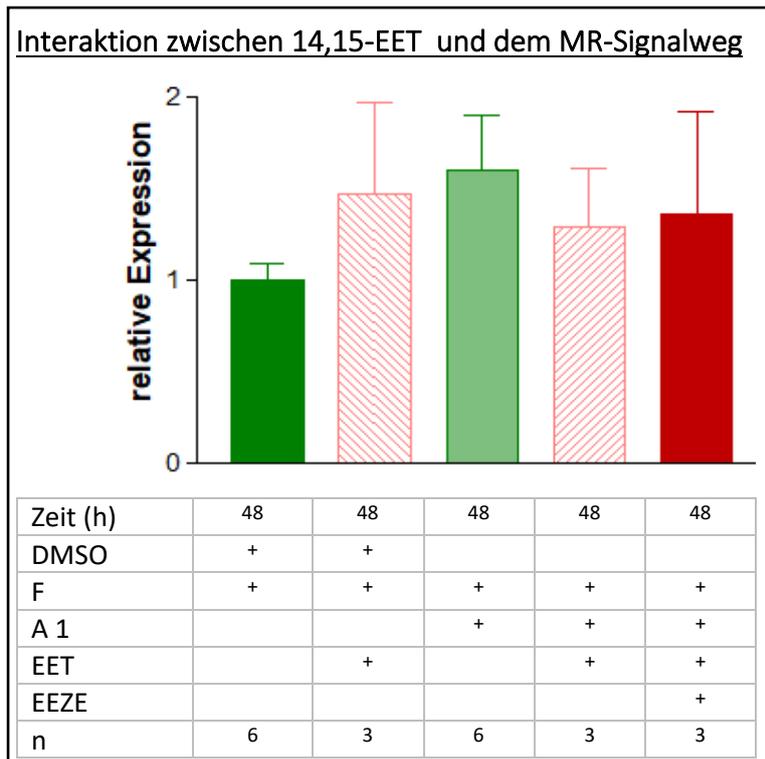


Abbildung 23: SCNN1A-Expression unter 14,15-EET zur Bewertung des MR-Signalwegs nach einer Behandlungsdauer von 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO mit F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede registrieren. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); EET = 14(15)-EET (1 μ M); EET-5(Z)-E, 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunden. n = 3.

Die Behandlung mit 14,15-EET und dessen strukturellen Antagonisten 14,15-EE-5(Z)-E zeigte, dass die transkriptionelle Kontrolle von SCNN1A nicht durch die EET-Signalkaskade moduliert wird.

Die Stimulation mit EET hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die SCNN1A-Expression und zeigte keine Interaktion mit einer Aldosteronbehandlung.

4.2.2.2.3. Der Mineralokortikoidrezeptor - NR3C2

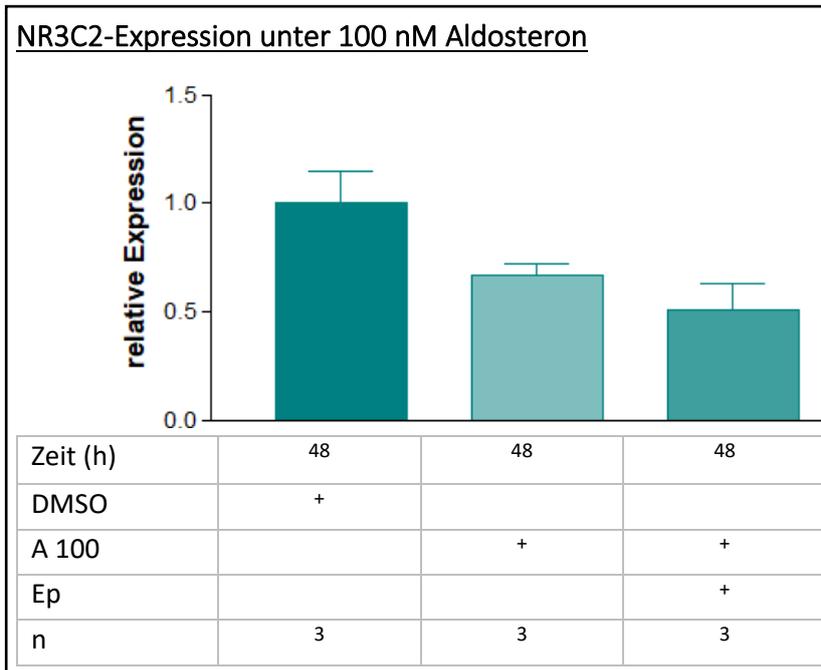


Abbildung 24: NR3C2 unter 100 nM Aldosteron nach 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serumstarvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: EIF2B1 und PPIA dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede registrieren. Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA, gefolgt von dem post-hoc Test nach Dunnett. A 100 = Aldosteron (100 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); h = Stunden. n = 3.

Bei einer Behandlung mit 100 nM Aldosteron zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollbehandlung und derjenigen mit Eplerenon ($p=0.055$). Auch wenn die Grenze der statistischen Signifikanz nur knapp verfehlt wurde, imponiert eine tendenzielle Reduktion der MR-Expression sowohl durch den MR-Agonisten (Aldosteron) als auch durch Antagonisierung (Aldosteron + Eplerenon).

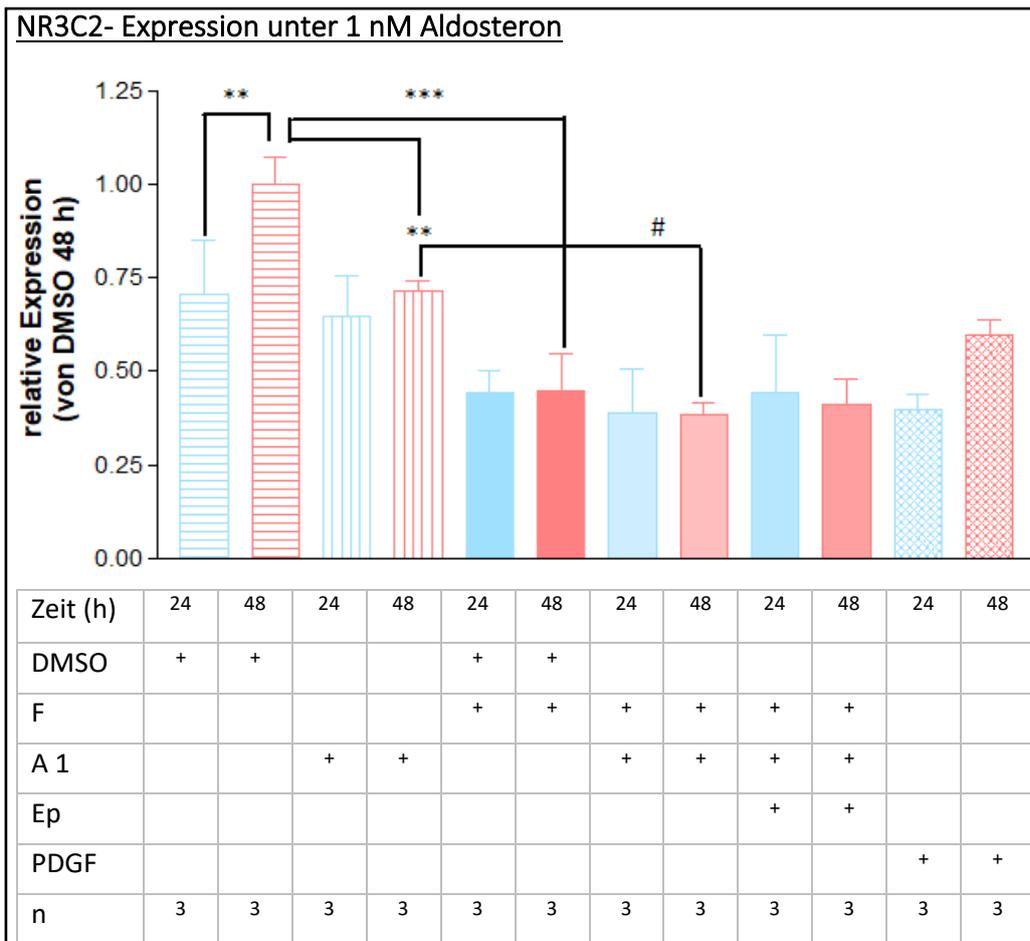


Abbildung 25: NR3C2-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24- und 48-stündiger Behandlung. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: PPIA und GAPDH und sind dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO +F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich signifikanten Unterschiede zwischen den 48-stündigen Expressionen mit DMSO zu der 24-stündigen DMSO-Behandlung, der 48-stündigen A-Behandlung, der Behandlung mit DMSO + F und zwischen der 48-stündigen A-Behandlung zu der 48-stündigen A + F-Behandlung. *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$ und # = $p < 0,01$; Signifikanz geprüft mit One-way ANOVA, gefolgt vom post-hoc Test nach Sidak. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml), h = Stunden. n = 3

Ein zeitlicher Einfluss auf die Expression war nur bei der Kontrollgruppe zu sehen. Die NR3C2-Expression stieg in der Kontrollgruppe durch die Verdopplung der Behandlungszeit signifikant an. Weitere Unterschiede waren in der 48-stündigen Behandlungsgruppe auffällig. Nach 48 h reduzierte die Zugabe von Aldosteron die Expression von NR3C2 signifikant. Durch Hinzunahme von Hydrocortison verstärkte sich dieser Effekt. Zwischen der 48-stündigen Aldosteronbehandlung und der Behandlung mit Hydrocortison und Aldosteron zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expression. Nach 48 h Aldosteron erzielte wurden vergleichbare Expressionswerte wie nach 48 h PDGF-BB-Behandlung gemessen.

Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass Aldosteron die Expression des MR in Form eines negativen Feedbacks hemmt.

4.2.2.2.4. Der Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 - AGTR1

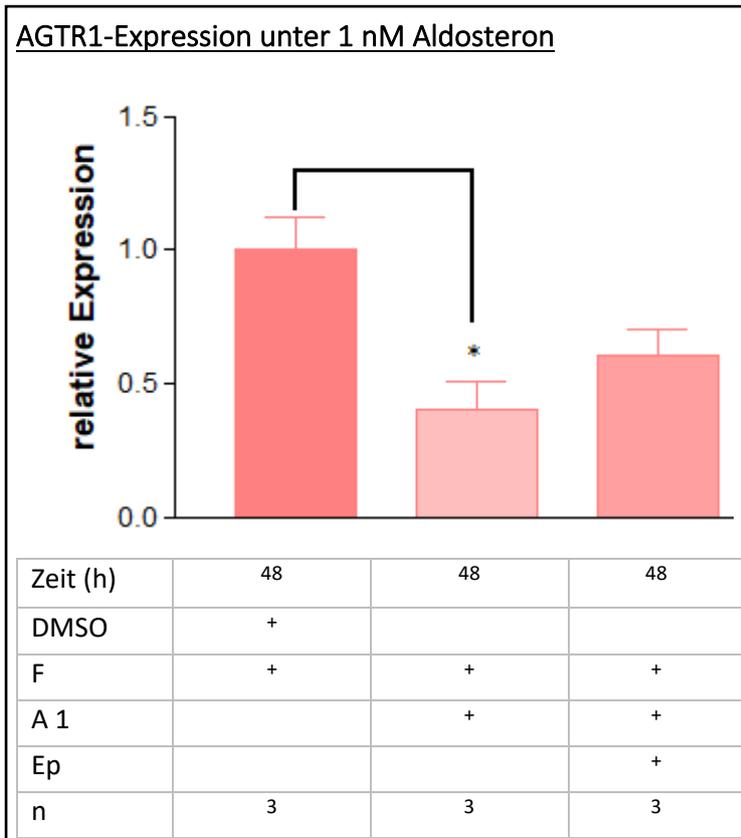


Abbildung 26: AGTR1-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO und F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die 48-stündige F + A-Behandlung zeigte gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied. * = $p < 0,05$ vs. DMSO + F. Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA und dem post-hoc Test nach Tukey. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h = Stunden. n = 3.

Die Untersuchung der Expression des Angiotensin-II-Rezeptors Typ 1 zeigte einen signifikanten aldosteronvermittelten Rückgang der Expression. Die kombinierte Behandlung mit Aldosteron und Eplerenon zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Aldosteron hatte einen hemmenden Effekt auf die AGTR1-Expression, welcher durch Eplerenon teilweise aufgehoben wurde.

4.2.2.3. EET-Signalkaskade

4.2.2.3.1. Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie - TRPV4

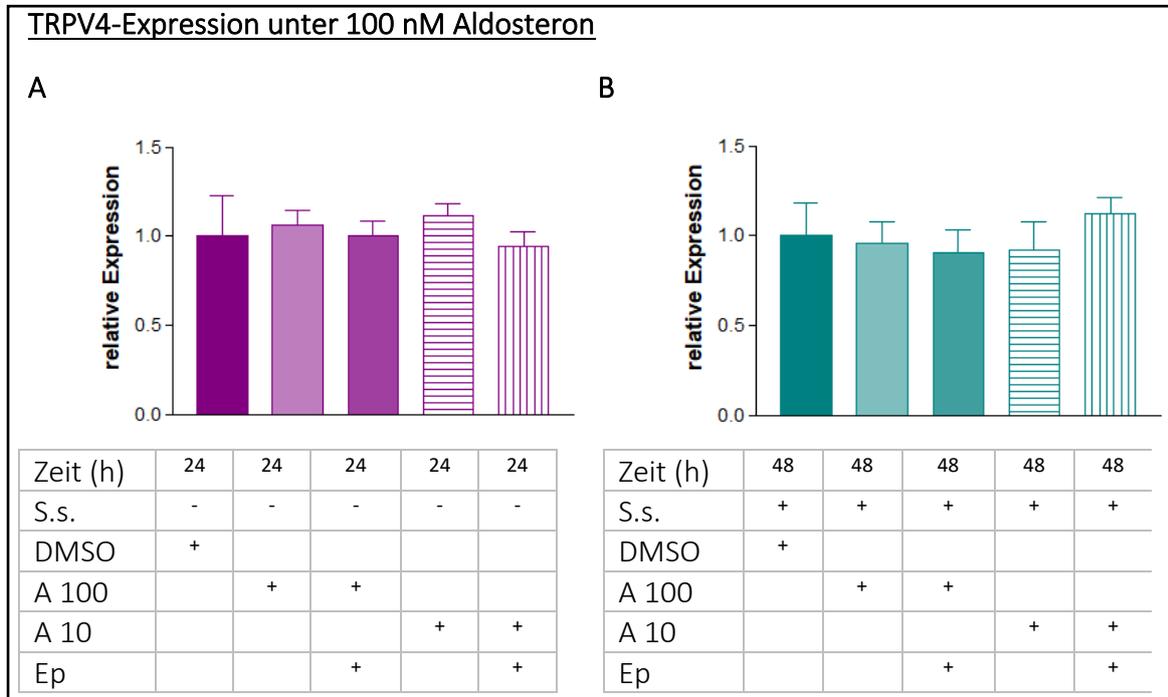


Abbildung 27: TRPV4-Expression unter 100 nM Aldosteron nach 24 h (A) und 48 h (B). Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: EIF2B1 und GAPDH und sind dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Bei (A) und (B) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der jeweiligen Behandlungszeit. Signifikanz geprüft mittels One-way ANOVA. A 100 = Aldosteron (100 nM); A 10 = Aldosteron (10 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); h = Stunden. n = 3.

Die TRPV4-Expression wurde durch die unterschiedlichen Behandlungen mit 10 nM und 100 nM Aldosteron mit und ohne Serum starvation nicht maßgeblich beeinflusst.

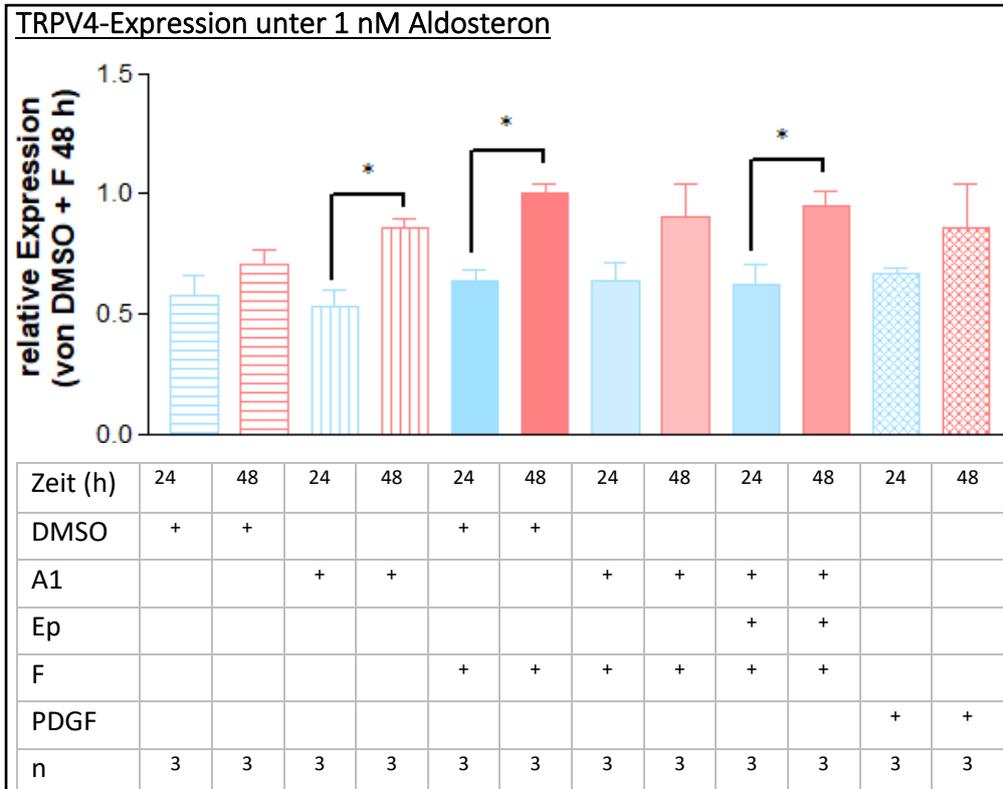


Abbildung 28: TRPV4-Expression unter 1nM Aldosteron nach 24 und 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Gruppen sind normiert auf die Haushaltsgene GAPDH und PPIA und sind dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO+F nach 48 h). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikanz getestet mit One-way ANOVA, gefolgt von dem post-hoc Test nach Sidak. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n = 3.

Die reine Kontrollbehandlung mit DMSO führte zu keiner Expressionszunahme. Die getrennte Applikation von Aldosteron oder Hydrocortison führte jeweils zu einer zeitabhängigen Zunahme der TRPV4-Expression.

4.2.2.3.2. Die porenbildende Untereinheit des BKCa-Kanals - KCNMA1

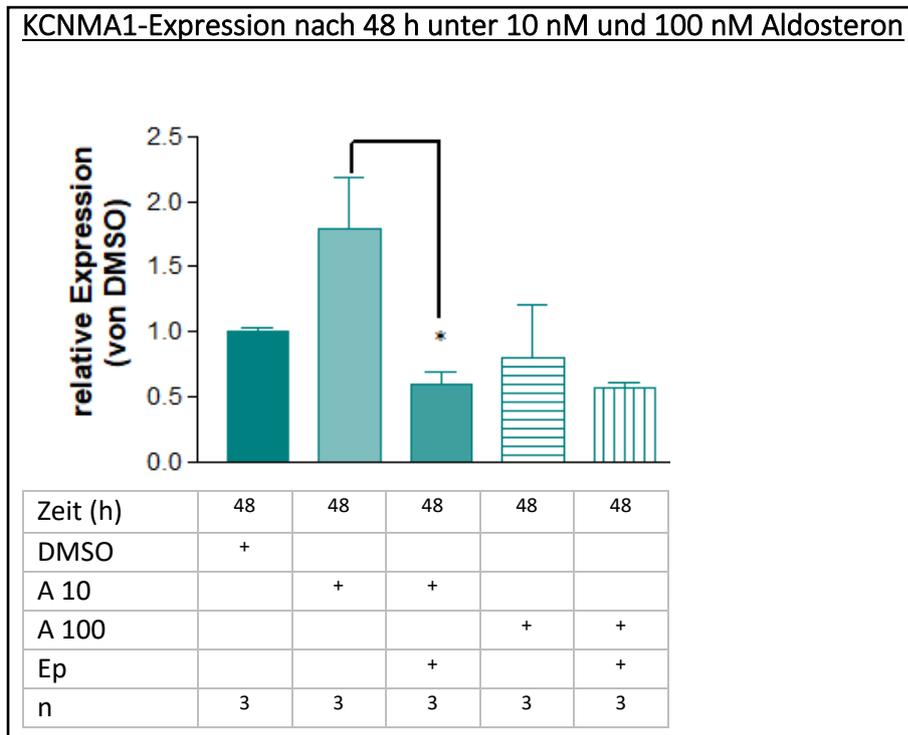


Abbildung 29: KCNMA1-Expression nach 48 h unter 10 nM und 100 nM Aldosteron. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: EIF2B1 und PPIA. Alle Ergebnisse sind dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Behandlung mit 10 nM A und 10 nM A + Ep (* = $p < 0,05$). Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA, gefolgt von dem post-hoc Test nach Tukey. A 10 = Aldosteron (10 nM); A 100 = Aldosteron (100 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); h = Stunden. n = 3.

Im Vergleich zu der Kontrollbehandlung zeigt die Behandlung mit 10 nM und 100 nM Aldosteron keine signifikanten Änderungen der Expression. Dennoch kann unter 10 nM Aldosteron ein signifikanter hemmender Effekt von Eplerenon beobachtet werden.

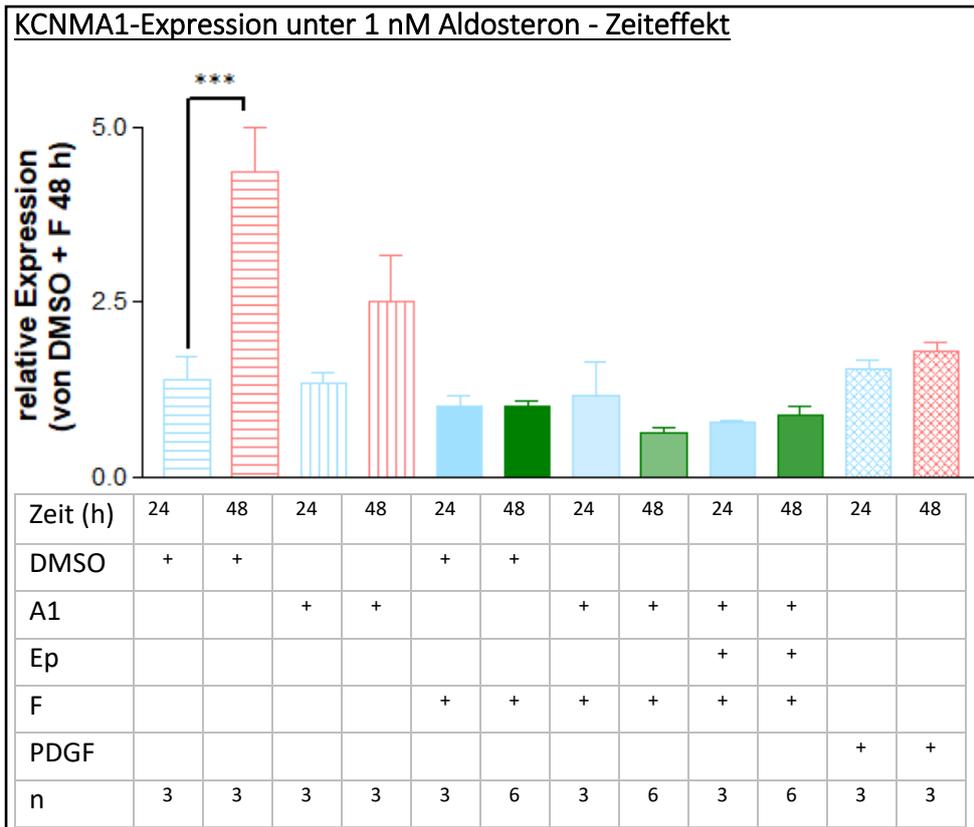


Abbildung 30: KCNMA1-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24 und 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: PPIA und GAPDH und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung nach 48 h (DMSO + F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Zeiten die Expression der 24-stündigen DMSO-Behandlung gegenüber der 48-stündigen DMSO-Behandlung signifikant erhöht. Signifikanz getestet mittels One-way Anova und dem post-hoc Test nach Tukey. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml), h = Stunden. n = 3.

Ein signifikanter zeitlicher Einfluss auf die KCNMA1-Expression ergab sich bei der DMSO Behandlung. Tendenziell war dieser Expressionsanstieg über die Zeit auch bei der alleinigen Aldosteronbehandlung zu erkennen. Die Hinzugabe von Hydrocortison hob den zeitlichen Effekt auf.

KCNMA1-Expression unter 1 nM Aldosteron - zeitabhängige Induktion

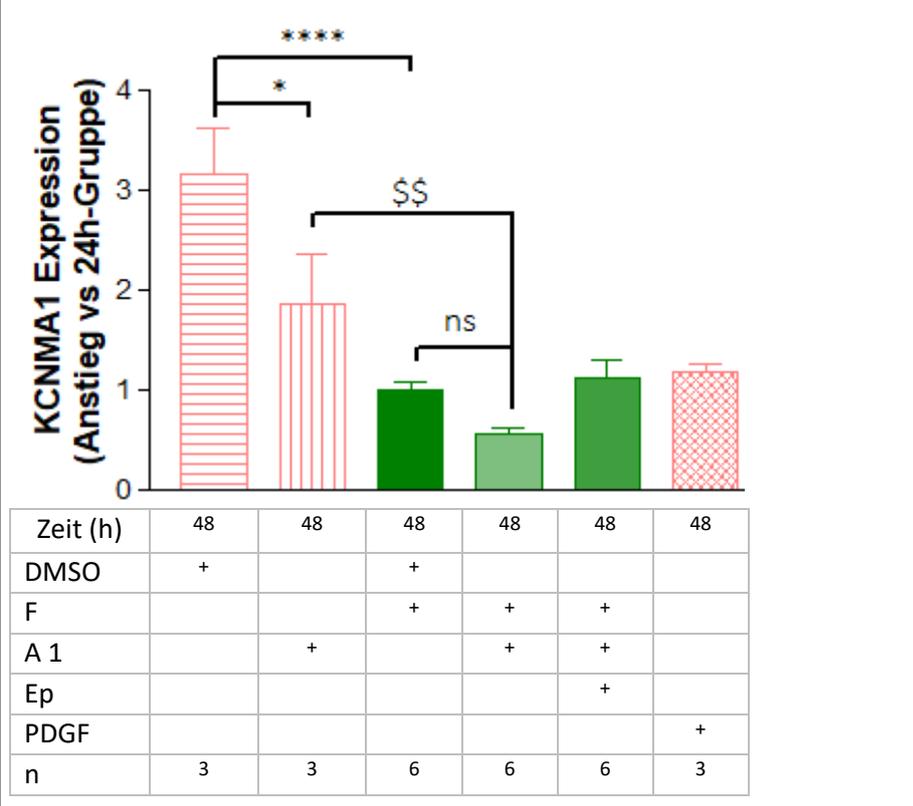


Abbildung 31: KCNMA1-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Alle Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: PPIA und GAPDH und dargestellt relativ zum Expressionsniveau derselben Behandlung nach 24 h. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der DMSO-Behandlung und der Aldo-Behandlung (* = $p < 0,05$) und zwischen der DMSO-Behandlung und der Behandlung mit DMSO und F (**** = $p < 0,0001$). Im Vergleich zu der Behandlung mit Aldosteron war die Expression nach mit F + A signifikant erniedrigt (§§ = $p < 0,01$). Signifikanz selektiv getestet mittels One-way ANOVA und dem post-hoc Test nach Sidak (ohne die Gruppen F+Aldo+Ep und PDGF). ns = nicht signifikant; A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n = 3.

Durch Darstellung der relativen Expression der 48 h Behandlungen zu dem Wert der gleichen Behandlung nach 24 h kann man sowohl die zeitabhängige Induktion als auch die Unterschiede zwischen den Behandlungen darstellen.

Es kam zu einer signifikanten Reduktion der zeitabhängigen KCNMA1-Induktion durch Aldosteron. Hydrocortison hemmte den Zeiteffekt vollständig. Die Hinzunahme von Hydrocortison steigerte auch den reduzierenden Aldosteron-Effekt weiter (ca. 50 % der 24 h-Gruppe). Im Vergleich zu Hydrocortison bestand in dieser Darstellungsweise kein signifikanter Expressionsunterschied nach Aldosteron- und Hydrocortisonbehandlung.

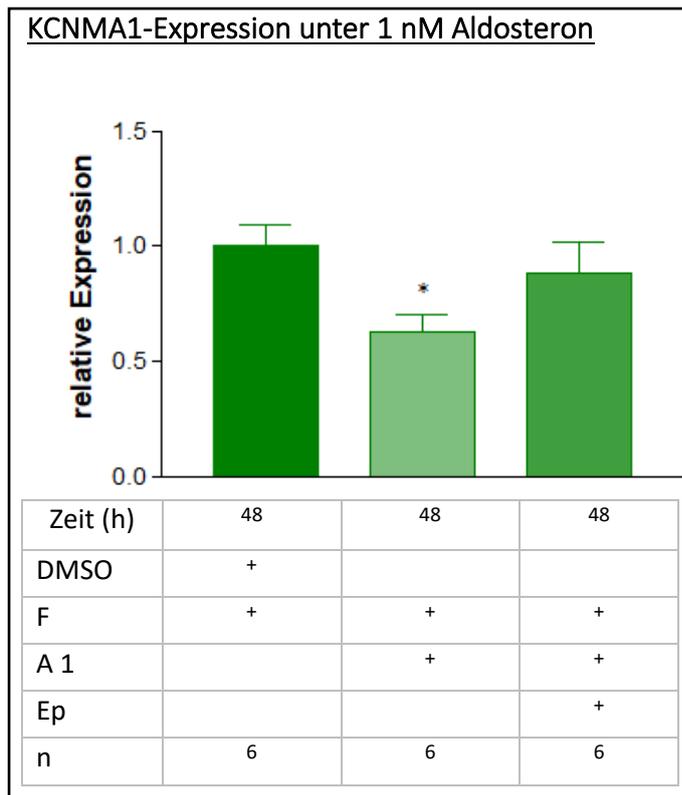


Abbildung 32: KCNMA1-Expression nach 48 h- Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO mit F). Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollbehandlung (DMSO + F) und der A + F-Behandlung festgestellt werden). * $p < 0,05$ vs. DMSO + F. Signifikanz getestet mittels One-way ANOVA, gefolgt von dem post-hoc Test nach Dunnett. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM), h = Stunden. n = 6.

Bei isolierter Betrachtung der drei Gruppen, die mit Hydrocortison behandelt wurden, führte die Behandlung mit Aldosteron zu einer signifikanten Reduktion der KCNMA1-Expression. Aldosteron zeigte demnach einen supprimierenden Einfluss auf die KCNMA1-Expression.

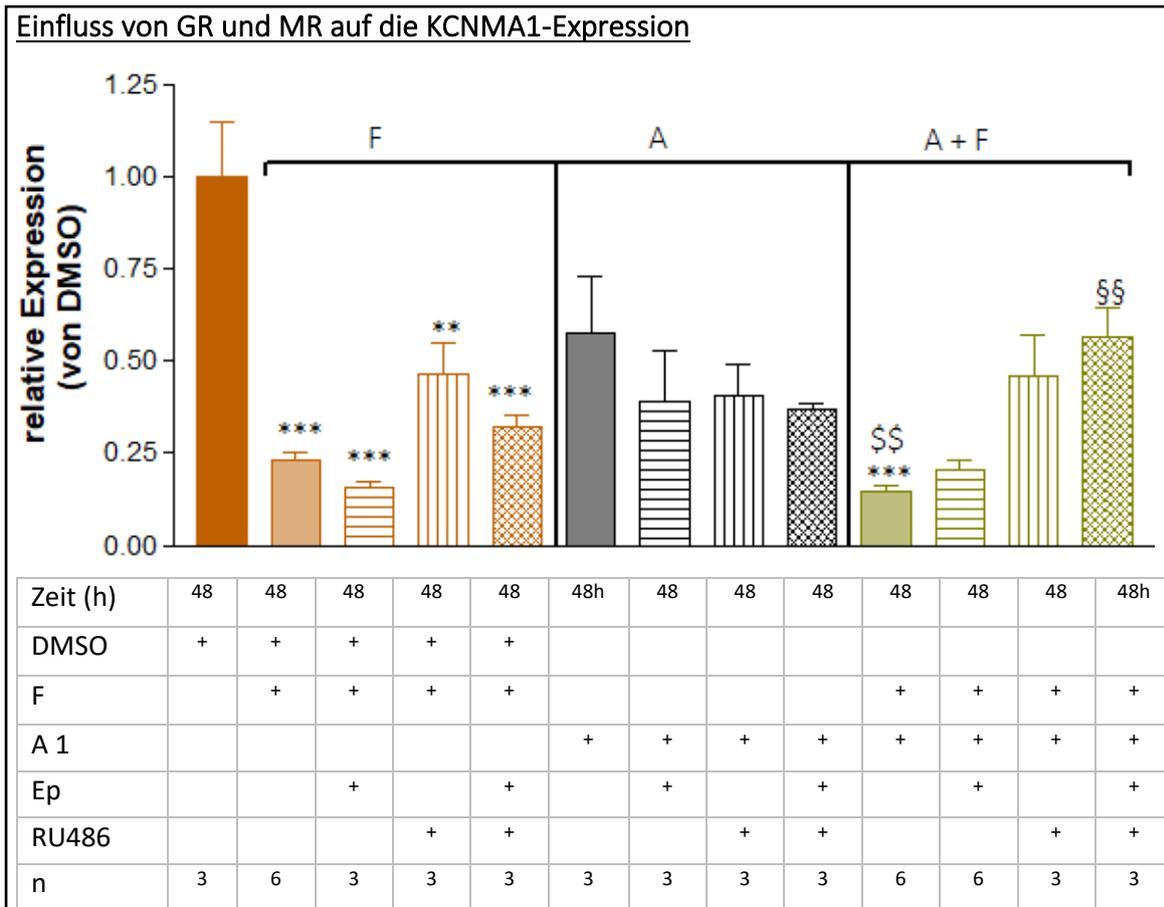
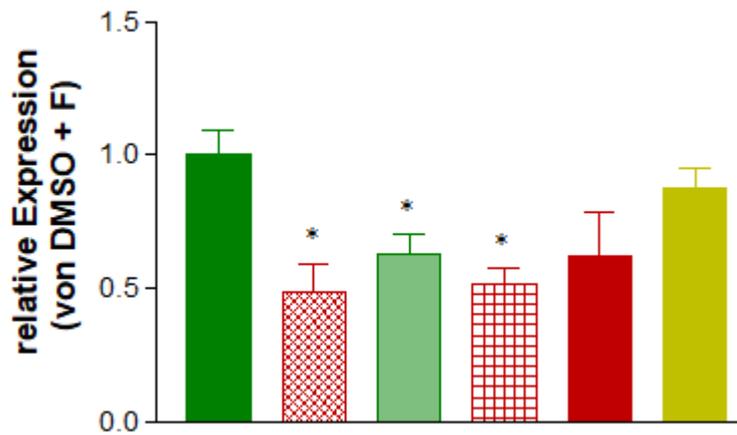


Abbildung 33: Einfluss von GR und MR auf die KCNMA1-Expression. Gezeigt sind verschiedene Behandlungskombinationen mit den Rezeptor-Antagonisten Ep und RU sowie den Agonisten F und A. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Sterne markieren die Unterschiede zu der Kontrollgruppe DMSO (***) = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$), die § zu A (§§ = $p < 0,01$) und die § zu A + F (§§ = $p < 0,01$). Signifikanz getestet mit One-way ANOVA und dem post-hoc Test nach Tukey. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); RU486 = Mifepriston (1 μ M); h = Stunden. n = 3, n = 6.

Um zu ergründen, ob die Reduktion der KCNMA1-Expression eher durch den Glukokortikoid- oder den Mineralokortikoidrezeptor vermittelt wird, folgte ein weiteres Experiment. Die Expressionsunterschiede deuteten bei der Behandlung mit Hydrocortison nicht rein auf einen MR-vermittelten Effekt, sondern eher auf einen GR-vermittelten Effekt (GR > MR). Aldosteron allein zeigte nur einen geringen supprimierenden Effekt auf die KCNMA1-Expression. Das Muster der Antagonisten unter alleiniger Cortisol-Stimulation ähnelte dem Muster unter kombinierter Stimulation (niedrigste Werte ohne Antagonist und mit Eplerenon, höchste Werte mit MifepristonAldo

allein oder in Kombination mit Eplerenon). Der Effekt von Aldosteron verblasste also auf dem Hintergrund der F-Behandlung. Interessanterweise gelang es durch keinen Antagonisten, wieder das Expressionsniveau der DMSO-Kontrolle zu erreichen, was auf MR- und GR-unabhängige Mechanismen hinweist. Der hemmende Effekt einer isolierten Aldosteronbehandlung war ebenfalls weder klar MR- noch GR-vermittelt.

Interaktion zwischen KCNMA1-Expression und 14,15-EET-Stimulation



Zeit (h)	48	48	48	48	48	48
DMSO	+	+				
F	+	+	+	+	+	+
A 1			+	+	+	+
EET		+		+	+	+
EEZE					+	
GSK						+
n	6	3	6	3	3	

Abbildung 34: KCNMA1-Expression unter 14,15-EET nach 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO + F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Signifikante Expressionunterschiede zu der Kontrollgruppe sind mit Sternen markiert: * = $p < 0,05$ vs. DMSO + F. Signifikanz getestet mit One-way ANOVA und dem post-hoc Test nach Sidak. A 1 = Aldosteron (1 nM); F = Hydrocortison (140 nM); EET = 14(15)-EET; EET-5(Z)-E (1 μ M), 14,15-EE-5(Z)-E (10 μ M); GSK = GSK2256294 (3,3 nM). h = Stunden. n = 3, n = 6.

Interessanterweise führte die Zugabe des EDHF 14,15-EET (EET) nicht - wie vermutet - zu einem Anstieg der KCNMA1-Expression, sondern zu einer signifikanten Reduktion des Expressionslevels. Es zeigte sich, dass die Expression von KCNMA1 durch EET ohne Epoxidhydrolaseinhibitor reduziert wird, egal ob als Hintergrundstimulation allein Hydrocortison oder Aldosteron mit Hydrocortison vorlag. Dieser Effekt schien durch die 14,15 EET-Struktur vermittelt zu sein, da er durch das strukturelle Analogon 14,15-EE-5(Z)-E aufgehoben werden konnte. Die nicht-signifikanten (nach Korrektur für multiples Testen, im t-Test A + F + GSK + EET vs. A + F + EET $p < 0,05$), in ihrer Tendenz jedoch suggestiven Effekte von EET + GSK legen nahe, dass der Abbau von EET an der Expressionsreduktion von KCNMA1 beteiligt sein muss, so dass die KCNMA1-Repression durch den Metaboliten, 14,15 DHET, bedingt sein könnte

4.2.2.3.3. Die Epoxidhydrolasen: EPHX1 und EPHX2

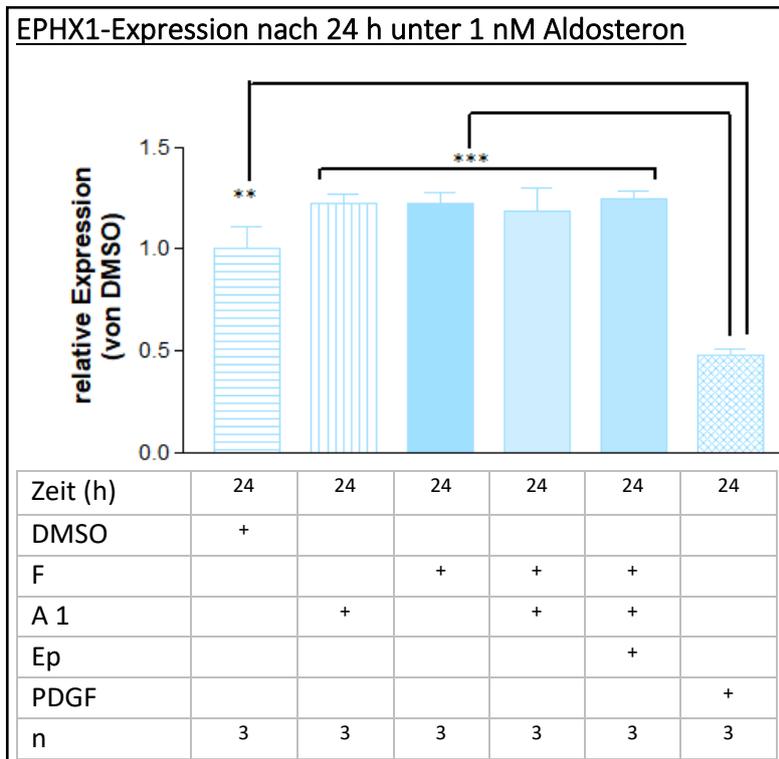


Abbildung 35: EPHX1-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 24 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der DMSO-Behandlung und der PDGF-Behandlung (** $p < 0,01$), sowie allen weiteren gezeigten Behandlungen vs. der PDGF-Behandlung (***) $p < 0,001$). Getestet mit dem One-way ANOVA und dem post-hoc Test nach Tukey. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h = Stunden. n = 3.

PDGF-BB zeigte nach 24-stündiger Behandlung eine signifikant geringere relative Expression im Vergleich zu allen weiteren Behandlungen. Die weiteren Behandlungen beeinflussten die EPHX1-Expression nur geringgradig und nicht signifikant.

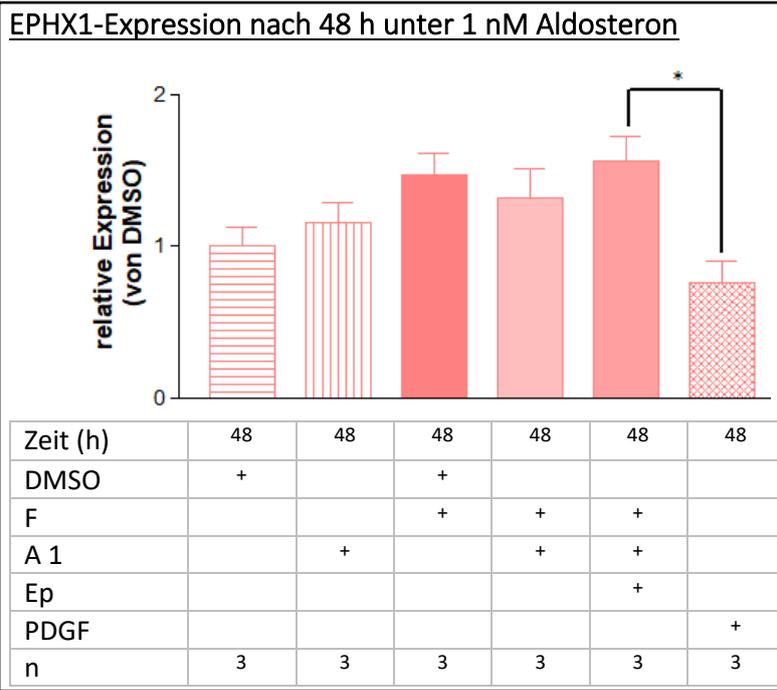


Abbildung 36: EPHX1-Expression unter 1 nM Aldosteron nach 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der F + A + Ep-Behandlung und der PDGF-Behandlung (* $p < 0,05$). Getestet mit dem One-way-Anova und dem post-hoc Test nach Tukey. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); PDGF = PDGF-BB, Platelet-derived growth factor-BB (10 ng/ml); h= Stunden. n = 3.

Nach 48 h war der supprimierende Effekt von PDGF-BB nur noch im Vergleich zu der gleichzeitigen Behandlung mit Hydrocortison, Aldosteron und Eplerenon statistisch signifikant.

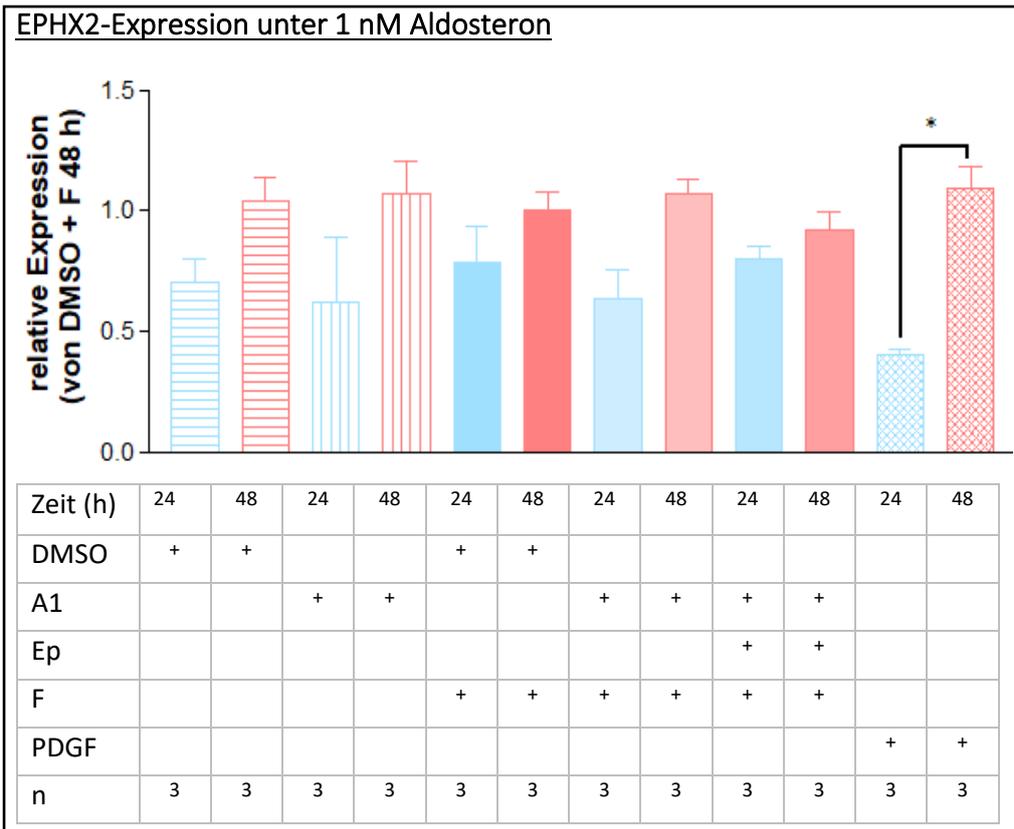


Abbildung 37: EPHX2-Expression nach 24 und 48 h. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu dem Mittelwert der Kontrollbehandlung (DMSO +F). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Expression unter PDGF war nach 48h signifikant gegenüber der 24-stündigen PDGF-Behandlung erhöht. Getestet mit dem One-way-Anova und dem post-hoc Test nach Tukey. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h= Stunden. n = 3.

Nach PDGF-Behandlung war die EPHX2-Expression nach 48-stündiger Behandlung signifikant gegenüber der 24-stündigen Behandlung erhöht. Die Expression von EPHX2 zeigte aber auch bei den anderen Behandlungen einen tendenziellen Anstieg über die Zeit.

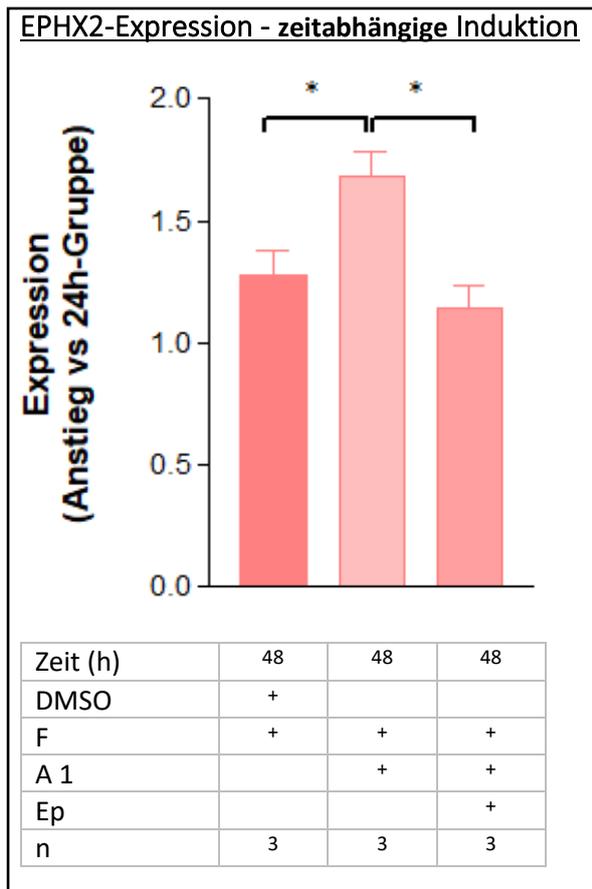


Abbildung 38: EPHX2-Expression nach 48h im Vergleich zur 24-stündigen Behandlung. Alle Behandlungen wurden im Anschluss an eine Serum starvation durchgeführt. Die Ergebnisse sind normiert auf das geometrische Mittel der Haushaltsgene: GAPDH und PPIA und dargestellt in relativer Expression zu der jeweiligen 24-stündigen Behandlung. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppen mit A und den zwei weiteren Gruppen (ohne A oder A mit F antagonisiert) (* = $p < 0,05$). Getestet mit dem One-way-Anova und dem post-hoc Test nach Dunnett. A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); h= Stunden. n = 3.

Die Untersuchung der in dieser Abbildung dargestellten drei Behandlungen nach 48 Stunden in Relation zu der jeweiligen 24-stündigen Behandlung zeigte, dass Eplerenon den zeitabhängigen EPHX2-Anstieg von Aldosteron mit Hydrocortison signifikant hemmt.

Die Expression beider Epoxidhydrolasen, EPHX1 und EPHX2, war in VSMC nachweisbar. Im Vergleich zwischen EPHX1 und EPHX2 war die Expression (gemessen an den ΔC_T -Werten) von EPHX1 in der Behandlung mit DMSO und Hydrocortison um den Faktor 120 höher als diese von EPHX2 (EPHX1: $0,24 \pm 0,02$, EPHX2: $0,002 \pm 0,0001$).

4.3. Western-Blot

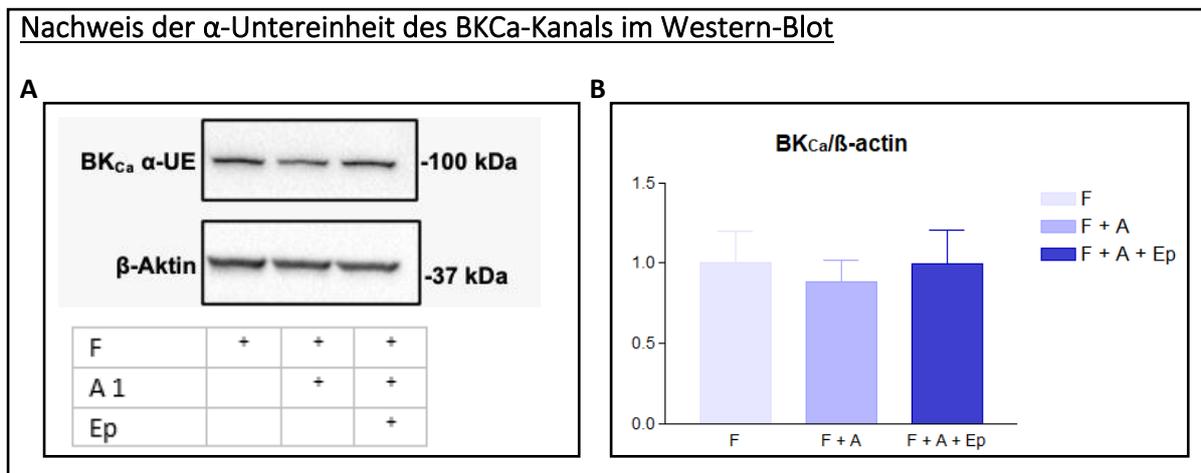


Abbildung 39: Western-Blot auf die BK_{Ca}- α -Untereinheit im Vergleich zum Haushaltsprotein: β -Aktin. A: Angegeben ist das Signal der Größenleiter. Die BK_{Ca} alpha-Bande läuft bei ca. 100 kDa, die beta-Aktin-Bande bei 42 kDa. Darstellung eines der 3 Western-Blots, zwischen den drei voneinander unabhängigen Durchgängen ergaben sich keine sichtbaren Unterschiede. B: Relative Unterschiede nach Quantifizierung der Banden. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Gemessen wurden die Gruppen mit F, F + A und F + A + Ep. n=4 Experimente pro Gruppe. A = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM); kDa = kilo Dalton; UE = Untereinheit.

Mittels Western-Blot wurde die α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals in den Gefäßmuskelzellen nachgewiesen. Alle Western-Blots zeigten ähnliche Ergebnisse. Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Unterschiede (siehe B). Das Ergebnis der RT-qPCR konnte demnach nicht auf Proteinebene bestätigt werden.

4.4. Kalzium-Bildgebung

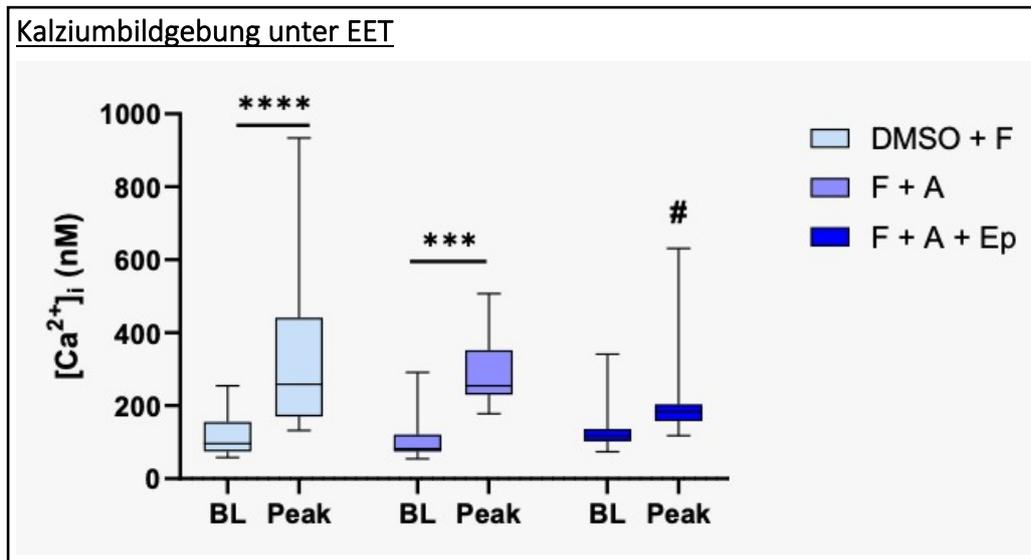


Abbildung 40: Box-Plot der Einzelzell-Kalzium-Transienten auf Stimulation mit EET. Gezeigt wird die intrazelluläre Kalziumkonzentration zu Beginn der Behandlung (BL) und jeweils das Maximum der intrazellulären Kalziumkonzentration nach der Zugabe von 1 μ M 14,15-EET (Peak). Die Sterne markieren jeweils den Unterschied zwischen dem Median der BL und dem Peak: *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$. Die Raute markiert den Unterschied des Medians des Peaks bei der A+F+Ep-Gruppe zu dem Median des Peaks der F-Gruppe # = $p < 0,05$. Signifikanz getestet mit One-Way Anova und dem post-hoc Test nach Tukey, n (Zellen/Anzahl der Experimente) = 17/3 (F), 18/3 (A + F), 23/3 (A + F + Ep). A 1 = Aldosteron (1 nM); Ep = Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM).

Der durch 14-,15-EET induzierte Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Peak) zeigte sowohl innerhalb der Behandlung mit Hydrocortison als auch in der Gruppe mit Aldosteron und Hydrocortison einen signifikanten Unterschied zu der Baseline. In der mit Hydrocortison, Aldosteron und Eplerenon behandelten Gruppe konnte kein signifikanter Kalziumpeak durch 14,15-EET ausgelöst werden. Im Vergleich zur Behandlung mit Hydrocortison (Kontrollgruppe) war der Kalziumpeak unter Eplerenon signifikant niedriger ($p < 0,05$). Eine Erläuterung zu dieser Ergebnisdarstellung befindet sich im Anhang.

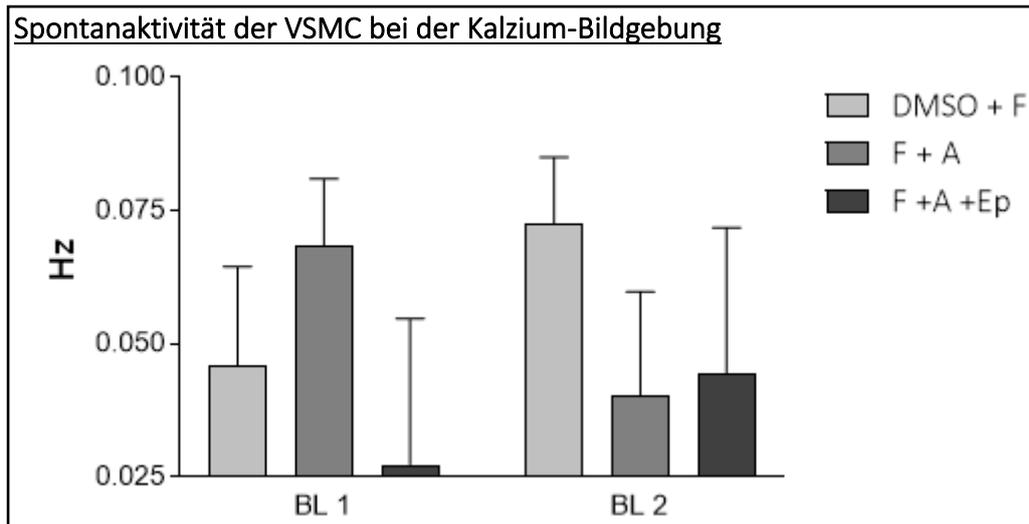


Abbildung 41: Frequenz der spontanen Peaks zwischen den Auswaschphasen (BL 1-BL 2) bei der Kalzium-Bildgebung. Dargestellt ist die Frequenz in Hertz von BL 1 bis BL 2, jeweils in allen drei Behandlungsgruppen. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Behandlung zeigte keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Spontanaktivität. Getestet mittels One-way Anova. BL = Baseline; A = Aldosteron (1 nM); Ep, Eplerenon (2 μ M); F = Hydrocortison (140 nM). n = 3.

Um zu bewerten, ob die Aldosteronbehandlung mit einer gesteigerten Spontanaktivität (intrazellulärer Kalziumanstieg ohne pharmakologische Stimulation) der Zellen einhergeht, wurde der spontane Kalziumanstieg in den Zellen analysiert. Zwischen den drei Behandlungsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion von primären humanen Gefäßmuskelzellen auf eine erhöhte Aldosteronkonzentration untersucht. Dabei wurde das Expressionsverhalten von Genen unter dem Aspekt verschiedener Signalwege betrachtet. Diese waren Marker des Phänotypen-Switch, Komponenten der Steroidsignalkaskade und der EET-Signalkaskade. Die stärkste Veränderung in seinem Expressionsverhalten auf die Aldosteronbehandlung zeigte der BK_{Ca}-Kanal. Mittels Western-Blot konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden. Durch die simultane Stimulation mit Hydrocortison wurde eine MR-Transaktivierung durch Glukokortikoide nachgeahmt, welche der physiologischen Situation in vivo näherkommt. Dies ist eine Stärke der vorliegenden Arbeit und wurde bisher bei zellulären Untersuchungen in dieser Form nicht angewendet. In Kombination mit Hydrocortison waren die transkriptionellen Effekte meist stärker ausgeprägt als unter Aldosteron allein. In der Kalzium-Bildgebung zeigten die mit Aldosteron behandelten Zellen keine funktionelle Einschränkung. Die Zellen konnten weiterhin unverändert auf die Behandlung mit 14,15-EET reagieren. Bei erhaltener zellulärer Antwort auf EET-Stimulation ist damit eine Steigerung der Antwort durch einen sEHI eine plausible Annahme. Daher wäre der nächste Schritt die Untersuchung eines sEHI mit dem endgültigen Ziel einer Therapie der aldosteroninduzierten Hypertonie.

5.2. Diskussion von Material und Methoden

Für die Experimente kamen primäre glatte Muskelzellen vom Menschen zum Einsatz. Da Primärzellen direkt dem Gewebe entnommen werden, gilt die mit dieser Methode einhergehende heterogene Zellpopulation oft als Nachteil. Die verwendeten Zellen wurden von der Bezugsfirma entsprechenden Qualitätskontrollen auf Expression von alpha-Aktin und der Abwesenheit von endothelialen Markern wie von-Willebrand-Faktor unterzogen. Dadurch wurde eine heterogene Zellpopulation ausgeschlossen.

Die meisten Versuche, zu dem Einfluss von Aldosteron auf glatte Muskelzellen, wurden mit Tierzellen durchgeführt (114–117). Forschungsergebnisse zu humanen Gefäßmuskelzellen nach Aldosteronbehandlung hingegen wurden z.B. durch Jaffe und Mendelsohn veröffentlicht (56). Hier wurden die Zellen von Patientenproben extrahiert aber anschließend immortalisiert. Durch die Aufhebung der Begrenzung von Zellteilungen gelten diese Zellen als modifiziert. Diese Modifikation kann durch die gesteigerte Proliferation den Phänotyp der glatten Muskelzellen verändern, wie es auch im Effekt von der PDGF-BB-Behandlung auf die MYH11-Expression in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Die bessere Kultivierbarkeit wird demnach auf Kosten einer eingeschränkten Vergleichbarkeit mit nativen glatten Muskelzellen erkauft.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit drei unterschiedlichen Aldosteronkonzentrationen gearbeitet. Die anfänglich verwendeten Konzentrationen von 100 nM und 10 nM Aldosteron, wie sie auch in der Literatur häufig Verwendung finden (115, 117), schienen bei näherer Betrachtung

im Vergleich zu den Werten bei PHA-Patienten recht hoch gewählt. Als Referenzwert diente im Folgenden die Arbeit von D. Heinrich aus dem Jahre 2018, welche mittels des in Deutschland geführten Conn-Registers Patienten mit PHA von 2008 bis 2018 untersuchte. Die mediane Plasma-Aldosteronkonzentration lag hier bei 0,794 nM (118). Damit ist die zusätzlich gewählte Konzentration von 1 nM näher an der pathophysiologischen Situation als 10 nM oder 100 nM. Es ist vorteilhaft, dass mit unterschiedlichen Aldosteronkonzentrationen gearbeitet wurde, denn so konnten die Ergebnisse besser mit der bestehenden Literatur verglichen werden.

Eplerenon diente als Antagonist des MR-vermittelten Effekts von Aldosteron. Alternativ kann auch Spironolacton eingesetzt werden, dennoch wirkt Eplerenon im Vergleich zu Spironolacton selektiver am MR (119). In einem Luciferase-Assay konnte gezeigt werden, dass 3 μ M Eplerenon die Wirkung von 0,5 nM Aldosteron vollständig blockiert (120). Auch die Transkriptionseffekte von 10 nM Aldosteron konnten durch 100 nM Eplerenon vollständig antagonisiert werden (121). Eine andere Studie zeigte, dass die genomisch induzierte Natrium-Protonen Austausch-Aktivität von 1 μ M Aldosteron durch Eplerenon mit einer IC50 von 20 nM gehemmt wurde (122). Die verwendete Konzentration von 2 μ M wird daher als suffizient angenommen.

Durch die Hinzunahme der Serum *starvation* konnten unerwünschte Effekte durch das fetale Kälberserum ausgeschlossen werden. Dies hilft bei der Interpretation der Ergebnisse, da alle Zellen die gleichen Voraussetzungen hatten. Andererseits kann die Serum *starvation* die Zellen unter eine Stresssituation stellen (123), welche allein ein Stimulus für Expressionsänderungen sein kann (124).

Analog der Physiologie wurde die Aldosteronbehandlung mit der Zugabe von physiologischen Konzentrationen von Hydrocortison ergänzt. Hierbei wurde eine Konzentration von 140 nM gewählt, wie sie sowohl morgens als auch nachmittags bei gesunden Probanden vorliegen kann (125, 126). Hydrocortison und Aldosteron können beide den MR binden. 11 β -HSD Typ 2 konnte funktionelle im glatten Muskel nachgewiesen werden (127), eine kombinierte Stimulation mit beiden Hormonen wurde bisher *in vitro* jedoch nicht durchgeführt.

Die Behandlung mit PDGF-BB wurde in den 90-iger Jahren von Owens et al. etabliert: Glatte Muskelzellen, welche mit PDGF-BB behandelt wurden, zeigen einen Phänotypwechsel von der kontraktilen zur synthetischen glatten Muskelzelle. Damit verbunden ist ein Rückgang der Markerproteine SM- α -Aktin (ACTA2) (128, 129) und Myosin schwere Kette (MYH11) (129). In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer PDGF-BB-Konzentration von 10 ng/ml gearbeitet. Das Medium wurde nicht, wie von Owens beschrieben, nach 8 – 12 h gewechselt. Allerdings sah man in den vorliegenden Experimenten auch ohne dieses Protokoll deutliche PDGF-BB-vermittelte Effekte, wie die Zunahme der MKI67-Expression. Über diese Kontrollbehandlung sollte bestimmt werden, ob ein Phänotypen-Switch unter den gegebenen Kulturbedingungen möglich ist und wie sich dieser zu den Änderungen unter Aldosteron und/oder Hydrocortison verhält.

5.3. Diskussion der Ergebnisse

5.3.1. Diskussion der RT-qPCR Ergebnisse

5.3.1.1. Diskussion der Ergebnisse zu den Markern des Phänotypen-Switch

5.3.1.1.1. α -Aktin: ACTA2

Für den glattmuskulären Phänotypen-Switch gilt die Reduktion der ACTA2-Expression als etablierter Marker (12). Eine aldosteroninduzierte Abnahme der ACTA2-Expression zeigte sich im Vergleich zur Kontrollbehandlung nicht. Unter den beschriebenen Bedingungen wurde stattdessen eine zeitabhängige Zunahme der ACTA2-Expression beobachtet.

Die längere Behandlungsdauer, in Kombination mit einer Serum starvation, steigerte die ACTA2-Expression signifikant. Der Differenzierungsgrad der Zellen, gemessen an der ACTA2-Expression, nahm demnach trotz der Behandlung mit Aldosteron über die Zeit zu. Der Einfluss der Serum starvation wurde ursprünglich nicht explizit untersucht, dennoch deuten die Ergebnisse auf eine Induktion des kontraktiven Phänotypen durch die Serum starvation hin. Eine Zunahme der ACTA2-Expression unter Serum starvation und über die Zeit wurde auch von Tharp et al. beim Vergleich der glattmuskulären α -Aktin-mRNA von einem auf sechs Tage im Serum freien Medium beobachtet (130). Dort wurde die Serum starvation durchgeführt, um die Expression der Differenzierungsmarker zu fördern. Die Induktion eines umkehrbaren „hyperkontraktiven“ Zustands der glatten Muskelzelle durch die Serum starvation wurde ebenfalls bereits 1998 bei der Untersuchung von kultivierten glatten Muskelzellen der Atemwege beschrieben (131). Diesen Effekt kann man durch die Wegnahme von Faktoren, wie dem humanen epidermalem Wachstumsfaktor und dem humanen Fibroblasten Wachstumsfaktor-Beta im Serum erklären, was insgesamt den kontraktiven Phänotyp der Zelle fördert.

Die Behandlung mit PDGF-BB zeigte ebenfalls eine Zunahme der ACTA2-Expression über die Zeit. Für PDGF-BB wurde in der Literatur eine ACTA2-Suppression beschrieben (128, 132). Blank und Owens beschreiben fünf Tage Kultur in einem serumfreien Medium (supplementiert u.a. mit Insulin, Ascorbat und Transferrin) bevor eine Behandlung mit PDGF-BB erfolgte (128). Die PDGF-stimulierten Zellen erreichten dort ein Minimum der α -Aktin-Proteinmenge nach 24 h und hielten dies bis 72 h nahezu konstant. Im Gegensatz dazu konnte die vorliegende Arbeit keine Abnahme der ACTA2-Expression nach 48 h unter PDGF-BB nachweisen. Diese Diskrepanz könnte ihren Ursprung in der Supplementierung des serumfreien Mediums bei Blank und Owens haben. Zusätzlich wurde dort mit einer anderen Zelllinie, glatte Muskelzellen der Rattenaorta, gearbeitet. PDGF-BB phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Elk-1, welches die Bildung von SRF an seine Zielstruktur verhindert und so eine Expression kontraktiver Proteine vermindert (18). Zusätzlich hemmt PDGF-BB auch über den *Krüppel-like-factor 4* u.a. die Expression von ACTA2 und MYH11 (19). Die bekannten Effekte von PDGF-BB scheinen in diesem Fall nicht zu wirken, was an einem dominierenden Einfluss der, den kontraktiven Phänotyp fördernden, Serum starvation liegen könnte. Diese These wird von den Ergebnissen zu MKI67 unterstützt, welche nur nach 24 h den proliferationsfördernden Einfluss von PDGF-BB zeigten.

Beim Vergleich der Gruppen mit alleiniger Aldosteronbehandlung und dieser mit zusätzlicher Eplerenon-Behandlung fiel auf, dass Eplerenon den signifikanten Anstieg der Expression über Zeit verhinderte. Daher kann man vermuten, dass die Expressionssteigerung von ACTA2 möglicherweise über den MR-Signalweg vermittelt wird. Hierbei wäre eine Signaltransduktion über die MR-vermittelte Steigerung der Polymerisation von Aktin über Rho/ROCK2 (133) denkbar, welche zu einer Aktivierung von Myocardin führt (Myocardin wiederum aktiviert SRF und folglich werden vermehrt kontraktile Proteine gebildet).

Zusammenfassend konnte ein aldosteroninduzierter Phänotypen-Switch anhand des ACTA2-Expressionsverhaltens im gewählten Zellkulturmodells nicht demonstriert werden.

5.3.1.1.2. Myosin schwere Kette - MYH11

In den vorgestellten Versuchen konnte keine supprimierende Wirkung von Aldosteron auf die MYH11-Expression bestätigt werden. Wie bei ACTA2 sah man auch bei der MYH11-Expression eine zeitabhängige Zunahme der Expression, diese hatte jedoch keine statistische Signifikanz. Im t-Test zeigte die Behandlung mit PDGF-BB nach 48 h eine signifikante Abnahme der MYH11-Expression gegenüber der 48-stündigen DMSO-Behandlung. Es konnte kein Einfluss von 14-15-EET auf die MYH11-Expression gezeigt werden.

Die Abnahme der MYH11-Expression unter Aldosteron-Behandlung wurde angenommen, da neben der Funktion als Markergen des Phänotypen-Wechsels (22, 23), auch bei vaskulären Veränderungen eine Expressionsabnahme demonstriert werden konnte (134). Stattdessen sah man hier eher eine Expressionssteigerung mit zunehmender Behandlungszeit. Bei ACTA2 konnte die Zunahme der Expression über die Zeit teilweise der Serum starvation zugeordnet werden. Die dort genannten Literaturquellen zeigten, dass auch Myosin schwere Kette auf Proteinebene durch die Serum starvation eine Expressionssteigerung erfährt (8, 130, 131). Ein Vergleich der Behandlungen mit und ohne Serum starvation war in diesem Fall nicht möglich. Dennoch kann vermutet werden, dass ähnlich wie ACTA2 die tendenzielle Steigerung der Expression über Zeit ebenfalls teilweise der Serum starvation zuzuschreiben ist. Auf die Effekte der Serum starvation wurden bei ACTA2 bereits näher eingegangen.

Für die Behandlung mit PDGF-BB wurde ein Rückgang der Expression des Markergens MYH11 erwartet (129). In den Versuchen zeigte sich, anderes als bei ACTA2, eine signifikante Abnahme der Expression nach 48 h, im Vergleich zur 48-stündigen DMSO-Behandlung (im t-Test). Ein ähnliches Resultat wurde in der Arbeit von Itoh et al. mit 4 ng/ml PDGF-BB nach 48 h Zellkultur demonstriert (135). Dieser Effekt entspricht dem Verständnis von MYH11 als Markergen des glattmuskulären Phänotypen-Switch (13). Anhand dieses Befundes kann angenommen werden, dass ein Phänotypen Wechsel unter den gegebenen Kulturbedingungen auch nach 48 h noch möglich ist. Offen bleibt aber, warum ACTA2 nicht entsprechend auf die PDGF-BB-Behandlung ansprach. Es wird angenommen, dass die Expression von ACTA2 und MYH11 gleichermaßen über den Signalweg einer SRF-vermittelten Induktion durch Bindung an eine speziellen DNA-Sequenz (CAR-G-Box) gesteuert wird (136). Es ist darauf hinzuweisen, dass sich die Ergebnisse von ACTA2 und MYH11 bei den durchgeführten Versuchen in ihrer Tendenz ähnelten. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei MYH11 erst nach 48 h Behandlung, dies ist unter Berücksichtigung der

Ergebnisse zu MKI67 verwunderlich, da sich dort eindeutige Effekte nach 24 h zeigten. Der Proliferationsmarker MKI67 wurde bereits nach 24 h Stimulation mit PDGF-BB hochreguliert. Die Repression von MYH11 zeigte sich erst nach 48 Stunden. Wahrscheinlich werden im untersuchten Zellsystem die Regulation von Proliferation und Differenzierung durch unterschiedliche Mechanismen reguliert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten greifen. Auch bei der MYH11-Regulation könnte, wie bei ACTA2 der Einfluss der Serum starvation überwogen haben, welche einen „hyperkontraktilen“ Zustand der VSMC bewirken kann (131).

Eplerenon und Mifepriston zeigten keinen Einfluss auf die MYH11-Expression, daher kann nicht von einer transkriptionellen Kontrolle über den MR- oder den GR ausgegangen werden. Tarjus et al. konnten mittels MR-knock-out Mäusen ebenfalls einen MR-vermittelten Einfluss auf die MYH11-Expression ausschließen (34).

Bekanntermaßen kann der glattmuskuläre Phänotyp durch den endothelialen Faktor NO moduliert werden (137). NO konnte bei Itoh et al. den supprimierenden Effekt von PDGF-BB aufheben (135). Daher wurde der Effekt von 14,15-EET (ebenfalls als endothelialer Faktor) auf die MYH11-Expression als Phänotypenmarker untersucht. Es konnte kein Einfluss von 14-15-EET auf die MYH11-Expression gezeigt werden.

Obwohl ein Phänotypen-Switch durch PDGF-Behandlung unter den gegebenen Kulturbedingungen nach 48 h nachweisbar war, konnte dies für die Aldosteronbehandlung nicht bestätigt werden.

5.3.1.1.3. Proliferationsmarker – MKI67

In der vorliegenden Arbeit wurde die MKI67-Expression in den VSMC untersucht, um mehr über den Einfluss von Aldosteron auf die Proliferation der Gefäßmuskulatur zu erfahren.

Die 24-stündige PDGF-BB-Behandlung zeigte eine signifikante Expressionssteigerung gegenüber allen weiteren Behandlungen. Die beschriebenen Resultate zeigten deutlich, dass unter den gegebenen Kulturbedingungen PDGF-BB eine Proliferationssteigerung induzieren konnte. Dieser Effekt wurde unter Aldosteron nicht beobachtet.

Nach weiteren 24 h, also einer Behandlungszeit von insgesamt 48 h mit PDGF-BB, nahm die MKI67-Expression wieder ab, sodass sich keine signifikanten Ergebnisse im Vergleich zu den übrigen Behandlungen ergaben. Dies könnte an dem Einfluss der Serum starvation liegen. Wie bereits bei ACTA2 beschrieben hat die Serum starvation, wahrscheinlich durch den Wegfall von Wachstumsfaktoren, einen differenzierenden Einfluss auf die VSMC (130, 131), welcher der Proliferation unter PDGF-BB entgegenwirken könnte. PDGF-BB wirkt über verschiedene Signalwege dedifferenzierend. Entscheidend ist die reduzierte Komplexbildung von SRF und Myocardin an den für den differenzierten Zustand typischen Genen (18, 19). Es scheint, dass die Effekte der Serum starvation dem Einfluss von PDGF-BB nach 48 h Behandlungszeit entgegenwirken. Offen bleibt aber, warum MKI67 nach 24 h positiv auf die PDGF-BB-Behandlung anspricht, während die Expression von ACTA2, MYH11 und SPP1 nach 24 h keinen signifikanten Effekt durch PDGF-BB zeigten.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass nach 24 h ein Übergang zu einer stark proliferativen VSMC möglich ist (gemessen an der MKI67-Expression), konnten zu diesem Zeitpunkt keine relevanten Einflüsse von Aldosteron auf die VSMC-Proliferation gezeigt werden.

Die Messung von Proliferation kann durch verschiedene Methoden vorgenommen werden. Jaffe et al. untersuchten den pathologischen Einfluss von Aldosteron und stellten eine aldosteronabhängige Förderung des Plazenta-Wachstumsfaktors (PGF) in glatten Muskelzellen von Mäusen und - als Proliferationsmarker - eine gesteigerte BrdU-Aufnahme fest. Der PGF spielt bei Zellproliferation und Gefäßentzündung eine Rolle. Die Ergebnisse entstanden allerdings nach einer stark abweichenden Methodik, welche auf einem in-vivo Wire-injury Modell basiert (138). Interessanterweise war nur bei Gefäßen, in denen das Endothel beschädigt worden war, eine Steigerung der BrdU-Aufnahme zu registrieren, welche durch Aldosteron nochmals erhöht wurde. Demnach war auch in diesem Kontext Aldosteron allein nicht hinreichend, um die glattmuskuläre Proliferation zu steigern. Daher könnte z.B. der Wegfall von endothelialen proliferationshemmenden Faktoren oder die Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion notwendig für eine aldosteroninduzierte Proliferationssteigerung in vivo sein. In Analogie hierzu wäre im experimentellen Aufbau der vorliegenden Arbeit z.B. die Stimulation der glatten Muskelzellen mit einem inflammatorischen Zytokin zusätzlich zur Aldosteronbehandlung notwendig gewesen.

Im Hinblick auf pulmonal-arterielle Hypertonie wurde in kultivierten pulmonalen Muskelzellen der Arterien von Mäusen ein signifikanter aldosteroninduzierter Anstieg von ki-67 beobachtet. Es wurde der relative ki-67 Anstieg in mit 100nM Aldosteron behandelten Zellen, ohne vorausgegangene Serum starvation, im Vergleich zum Kontrollprotein gemessen (139). Wie bereits gezeigt hat die Serum starvation - wahrscheinlich durch den Wegfall von dedifferenzierenden Faktoren im Serum - Einfluss auf die MKI67-Expression. Allerdings konnte in den durchgeführten Versuchen auch ohne Serum starvation kein proliferationsfördernder Effekt von 100 nM Aldosteron auf die MKI67-Expression gezeigt werden. Ein weiterer Faktor, der die unterschiedlichen Resultate erklären könnte, ist die Tatsache, dass die Zellen aus der Pulmonalarterie stammen und sich von den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen aus Koronararterien unterscheiden (140).

Min et al. untersuchte den Einfluss von Aldosteron auf die Zellproliferation von VSMC aus der Aorta von Ratten, um die pathologischen kardiovaskulären Zusammenhänge besser zu verstehen. Auch hier hatte eine Aldosteronbehandlung einen proliferationsfördernden Effekt. Die Zellen wurden mit einer 12-stündigen Aldosteronkonzentration von 1 nM behandelt, nachdem eine 48-stündigen Serum starvation erfolgte. Die Messung der Proliferation erfolgte mittels Inkorporation von radioaktiven Stoffen in der DNA (141). Diese Methode ist sensibler als die Messung von der MKI67 Expression mittels qPCR da sie einen größeren dynamischen Bereich abdeckt. Zum einen erfolgte hier eine doppelt so lange Serum starvation und zum anderen eine andere, sensiblere Versuchsmethode, welche beide ursächlich für die Diskrepanzen zu den gezeigten Resultate sein können.

Eine Studie, welche zu dem gleichen Ergebnis kam, war von Cascella et al.. Diese Gruppe zeigte, dass einen 48-stündige Behandlung mit 10 nM Aldosteron in serumfreiem Medium keinen proliferationsfördernden Effekt hatte. Dies wurde anhand von Zellzählungen nach der Behandlung mit Trypanblau festgestellt (142). Die Zellen stammten von der Aorta des Schweins. Also liegt auch hier eine abweichende Herkunft für die VSMC vor.

Zusammenfassend gibt es sowohl Arbeiten, welche einen proliferationsfördernden Effekt zeigen konnten, als auch solche wo dieser ausblieb. In allen Fällen lag eine abweichende Methodik vor, sodass letztendlich offenbleibt, ob Aldosteron die Proliferation von VSMC fördert oder einen neutralen Effekt hat.

5.3.1.1.4. Osteopontin - SPP1

Osteopontin ist ein Zytokin, welches in der Literatur bereits in Verbindung mit Aldosteronexzess und der Plastizität der glatten Muskelzelle gebracht wurde (143). Die Untersuchung von SPP1 sollte dem Nachweis des aldosteroninduzierten Phänotypen-Switch dienen.

Es konnten keine signifikanten Effekte von Aldosteron oder Hydrocortison auf die Expression von Osteopontin gefunden werden. Diese Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu der Literatur und können wie folgt erklärt werden.

Die Ergebnisse von Rocha et al. zeigten nach 14 Tagen Aldosteronbehandlung (zusätzlich zu einseitiger Nephrektomie und Gabe von 1 % NaCl im Trinkwasser) in vivo eine über die Zeit zunehmende Steigerung der SPP1-Expression per qPCR aus Herzmuskelgewebe. Per in situ-Hybridisierung wurde als Quelle der RNA Zellen der Media von Koronararterien, also mit hoher Wahrscheinlichkeit glatte Muskelzellen, ausgemacht (26). Diesen Befunden stehen Beobachtungen entgegen, die in Aldosteron behandelten VSMC in vitro einen Anstieg der SPP1-Expressions auf ein Maximum nach 6 h, mit einem anschließenden Abfall auf Werte ähnlich denen des Ausgangsniveaus schon nach 18 h zeigten. Die Proteinexpression ließ sich jedoch zeitabhängig steigern (142). Möglicherweise könnte auch die lange Aldosteronexposition über mehrere Wochen notwendig sein, um die mRNA-Expression in vivo persistierend hochzuhalten. Der Befund einer kurzen mRNA-Halbwertszeit kann sehr gut erklären, warum im Fall der vorgestellten Experimente keine aldosteronvermittelte SPP1-Expression berichtet werden kann, da hier alle Zellen frühestens nach 24 h analysiert wurden, was eine Erfassung von transienten, früher auftretenden Effekten ausschließt.

Die PDGF-Behandlung für 24 h konnte keine SPP1-Steigerung bewirken. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der starken Proliferationssteigerung (siehe Expression MKI67) durch PDGF-BB, welche die erhöhten MKI67-Expressionen beweisen. Da der Phänotypen-Switch mit einer Proliferationssteigerung in Verbindung gebracht wird, könnte hier entweder eine Entkopplung zwischen Proliferation und Phänotypen-Switch vorliegen, oder SPP1 ist in diesen VSMCs kein geeigneter Marker des synthetischen Phänotypen.

Die Behandlung mit 14,15-EET zeigte keine signifikanten Expressionveränderungen im Vergleich zu der Kontrollbehandlung mit Hydrocortison oder der Behandlung mit Hydrocortison und 1 nM Aldosteron. Die Hinzunahme des strukturellen Analogons 14,15-EE-5(Z)-E zu 1 nM Aldosteron und 14,15-EET ergab die höchsten SPP1-Expressionswerte (im t-Test gegen DMSO + F: $p = 0,0142$). Eine Rolle des EET-Signallings in der Kontrolle des glattmuskulären Phänotyps ist demnach denkbar. Dies wäre demnach im Sinne der Aufrechterhaltung eines kontraktiven Phänotyps. Wang und Kollegen konnten zeigen, dass eine vermehrte sEH-Expression, und damit ein ver-

mehrter Abbau von EETs, die Expression von Osteopontin steigert. Zudem reduzierte die exogene Applikation von EETs oder sEHI die glattmuskuläre Migration (144). Diese Befunde stützen die Annahme, dass EETs den glattmuskulären Phänotyp modulieren können und können indirekt auch den Befund erklären, dass im Falle der vorgestellten Ergebnisse der EET-Antagonist die SPP1-Expression steigerte.

5.3.1.1.5. α -1C Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals - CACNA1C

Die Versuche zeigten eine stabile Expression der porenbildenden α 1C-Untereinheit des LTCC und keine Expressionsänderung in den drei verschiedenen Behandlungsgruppen.

Unter der Voraussetzung, dass die unveränderten CACNA1C-RNA-Level auf Proteinebene ebenfalls unverändert fortbestehen, wäre dieses Expressionsverhalten eine weitere Erklärung für die unveränderte Expression von ACTA2 und MYH11. Die Expression dieser Markergene wird über das durch den LTCC eintretende Kalzium beeinflusst (31).

Die von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten MR-*knock-out* Experimente zeigten sowohl eine MR-abhängige Senkung der Expression (32), als auch keine Beeinflussung der LTCC-Expression (34). Da sich die in den Experimenten verwendeten Mäuse in ihrem Alter um mehr als vier Monate unterscheiden, könnte hier der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse liegen. Die Gruppe mit den Veränderungen in der Expression nutzte den Acta2-Promotor und benutzte für die Versuche Mäuse im Alter von 9 Monaten. Die Gruppe von Tajus et al. nutzte für das Maus-Modell den Sm22-Promotor und verwendete Mäuse im Alter von 4 Monaten. Die Differenzen können also neben dem Alter der Mäuse auch an dem MR-*knock-out*-Modell liegen. Die Promotoren könnten z.B. zur Zeit der Induktion eine unterschiedliche Aktivität zeigen. Insgesamt kann man auf der Basis der zitierten glattmuskulär spezifischen MR-KO-Modelle nicht auf eine zweifelsfreie Rolle des MR für die Expression von CACNA1C schließen.

10nM Aldosteron bewirkte in der Studie von Mesquita et al., dass sich nach 24 h der LTCC vermehrt in den Gefäßmuskelzellen von Ratten nachweisen ließ. Diese veränderte Expression war auch mittels Western-Blot auf Proteinebene sichtbar und kam durch eine Förderung der langen, kardialen Kanalform zustande. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass dieser Anstieg durch Bindung des MR an *glucocorticoid response elements (GRE)* vermittelt wird (35). Die Aldosteronkonzentration war bei Mesquita um eine Größenordnung höher als in den Experimenten der vorliegenden Arbeit und es fand keine Co-Stimulation mit Glukokortikoiden statt. Umgekehrt konnte bei Mesquita et al. Dexamethason als exklusiver Ligand des Glukokortikoidrezeptors ebenfalls die Expression der Cacna1c-Isoform steigern. Die Cacna1c-Induktion durch Aldosteron konnte zwar auch *in vivo* in Mauserzen per Western-Blot nachgewiesen werden, also in Gegenwart physiologischer Glukokortikoidkonzentrationen, der Zelltyp, in dem diese Induktion erfolgte bleibt jedoch auf Basis dieser Ergebnisse unklar. Diese methodischen Differenzen könnten der Grund für das Ausbleiben von Expressionsunterschieden sein. Eine amerikanische Forschungsgruppe beschreibt ebenfalls keine Änderung der Cacna1c-Expression in Mesenterialarterien der Maus nach zweiwöchiger Aldosteroninfusion (145).

Damit kann keine einheitliche zusammenfassende Aussage erfolgen, weder ob vermehrte noch ob verminderte MR-Stimulation eine Änderung der Cav1.2-Expression in glatten Muskelzellen bewirkt. Möglicherweise ist eine bisher unzureichende Berücksichtigung der Rolle von Glukokortikoiden der Schlüssel für diese Heterogenität.

5.3.1.2. Diskussion der Ergebnisse zu den Strukturen für transkriptionelle Marker der MR-vermittelten Signaltransduktion

5.3.1.2.1. HSD11B1 und HSD11B2

Die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (11 β -HSD) Typ 1 und Typ 2 konnten in den hier gezeigten Experimenten wie auch in anderen Arbeiten (56, 127, 146) erfolgreich in den glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden. In den Experimenten zeigte sich ein stabiles Expressionsniveau von 11 β -HSD Typ 1, welches unabhängig von der Aldosteron- oder Eplerenon-Behandlung war. Insgesamt war der C_T-Wert bei Nachweis von 11 β -HSD Typ 2 mRNA höher. Aufgrund der stärkeren Expression von 11 β -HSD Typ 1, ist es gut vorstellbar, dass der MR in den Gefäßmuskelzellen auch von Glukokortikoiden gebunden wird.

Dass Cortisol den MR binden kann, wurde unter anderem von Jaffe und Mendelsohn gezeigt: Bei der Behandlung mit 10 nM Cortisol wurde ein MR-Rezeptorkonstrukt (MRE-Reporter) 25-fach induziert, bei einer Behandlung mit 100 nM Aldosteron wurden die MRE-Reporter nur ca. 8-fach induziert (56). Zusätzlich sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Affinität von Cortisol für den MR höher ist als die von Aldosteron. Bei der physiologische höheren Konzentration von Cortisol als diese von Aldosteron im Cytosol (44) ist die 11 β -HSD Typ 2 sehr wichtig. In einer Studie von Jaffe und Mendelsohn wurde die 11 β -HSD Typ 2 durch Glycyrrhetinsäure gehemmt, daraufhin nahm die Aktivierung des MRE durch Cortisol signifikant zu (56). Dieses Ergebnis verdeutlicht die funktionelle Eigenschaft des Enzyms. Wenn es durch Mutation zu einem starken Mangel an 11 β -HSD Typ 2 kommt, entsteht das Krankheitsbild des klassischen apparenten Mineralokortikoid-Exzess-Syndroms. Aber auch eine Verminderung der 11 β -HSD Typ 2 (z.B. beim nonclassic apparent Mineralocorticoid Excess Syndrome) zeigt im Alter klinische Folgen in Form von Bluthochdruck und verdeutlicht die klinische Bedeutung der 11 β -HSD Typ 2. (147)

Ein spezifischer Effekt von Glukokortikoiden auf die HSD11B1-Expression wird in vielen Zelltypen diskutiert (siehe: Chapman et al. (148)) im spezifischen Fall von VSMCs konnte dies aber nicht gezeigt werden (149). Daher muss für die vorgestellten Experimente nicht befürchtet werden, dass ein Effekt von Aldosteron und Cortisol auf die HSD11B1-Expression durch den Vergleich mit der Cortisol-Referenzgruppe maskiert wird.

5.3.1.2.2. α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals - SCNNA1

An distalen Tubulusepithelzellen der Niere führt ein Anstieg des Aldosteronspiegels über die Aktivierung des MR zu einem vermehrten Einbau von eNaC in die Plasmamembran (57). Der Natriumkanal setzt sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammen. In den VSMCs konnte das Vorkommen der α -Untereinheit 2008 demonstriert und seine negative Beeinflussung durch eine salzhaltige Diät bei Mäusen gezeigt werden (150). Daher kann die Expression dieses Kanals auch in diesen Zellen Rückschlüsse auf die MR-Aktivität geben.

Jaffe und Mendelsohn stellten in ihren Untersuchungen 2005 mit menschlichen Gefäßmuskelzellen zwar fest, dass SCNNA1 in mit Aldosteron behandelten VSMCs nicht detektierbar waren (56). Diese Aussage kann als aber überholt beschrieben werden. Wie bereits erwähnt konnte die α -Untereinheit in den VSMC 2008 demonstriert werden. Die Differenzen lassen sich höchstwahrscheinlich in der Methodik erklären. Die Aussage dass die Untereinheit nicht nachweisbar ist beruht auf einem Microarray, welche je nach Gen gegenüber einer qPCR eine geringere Sensitivität aufweisen kann (151).

In den zu diskutierenden Experimenten war die α -Untereinheit des eNaC in der qPCR nachweisbar und es zeigte sich durch die Behandlung mit Aldosteron (allein und in Kombination mit Hydrocortison) ein tendenziell positiver Effekt auf die Expression des Gens. Es kamen vermutlich keine signifikanten Unterschiede zustande, da das Expressionslevel allgemein niedrig war. Dennoch ist durch Stimulation mit erhöhtem Aldosteronniveau eine vermehrte Expression dieses Kanals bei PHA-Patienten vorstellbar.

Der eNaC steht in den Gefäßmuskelzellen zusätzlich in Verbindung mit der Regulation des myogenen Tonus (64–66). Daher ist durch diese mechanosensitiven Eigenschaften über eine gesteigerte druckinduzierte Vasokonstriktion eine zusätzliche Beteiligung dieses Kanals an der Generation der aldosteroninduzierten Hypertonie denkbar.

Die α -Untereinheit des eNaC unterliegt in Nierenzellen auch der positiven Regulation von Glukokortikoiden (152, 153). In den VSMCs konnte ein GR-vermittelter Effekt auf die SCNNA1-Expression nicht bestätigt werden. Dennoch weisen die Gruppen, welche mit Mifepriston in Kombination mit Aldosteron oder Hydrocortison behandelt wurden, jeweils niedrigere Expressionen auf als diese ohne Mifepriston. Daher ist es gut vorstellbar, dass in den VSMCs neben dem MR auch über den GR-Einfluss auf die eNaC-Expression genommen werden kann.

Arbeiten mit Zellen des kortikalen Sammelrohrs ergaben, dass 11,12-EET die Aktivität von eNaC senkt. Dies wirkte sich langfristig auch auf die Menge der Ionenkanäle aus (154, 155). Daher könnte eine Behandlung mit sEHI potenziell eine durch Aldosteron induzierte ENaC-Expression funktionell entgegenwirken. Für die glatten Muskelzellen konnte in der vorliegenden Arbeit zumindest eine direkte Wirkung von 14,15-EET auf die SCNN1A-Expression nicht bestätigt werden. Ergebnisse zur kombinierten Wirkung von EET und sEHI stehen noch aus.

5.3.1.2.3. Mineralokortikoidrezeptor - NR3C2

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich, dass Aldosteron die Expression des MR signifikant reduziert und dass sich dieser Effekt bei Anwesenheit von Hydrocortison weiter verstärkt. Aber auch die isolierte Hydrocortisonbehandlung ist für eine signifikante Abnahme der MR-Expression verantwortlich. Bei gleichzeitiger Applikation dominierte der Effekt von Hydrocortison.

Der supprimierende Effekt von Aldosteron auf die MR-Expression wurde auch von anderen Autoren beschrieben. So konnte 2020 festgestellt werden, dass Aldosteron in der Niere von Mäusen die miRNA-466 induziert, welche wiederum den MR herunterreguliert (156). Dies bestätigt die These, dass Aldosteron in Form eines negativen Feedbacks die MR-Expression hemmen kann.

Der gezeigte, supprimierende Effekt auf die NR3C2-Expression von Hydrocortison könnte die Erklärung für das Ausbleiben vieler genomischer Effekte unter Aldosteron sein. Wie anfangs beschrieben nimmt der MR eine Schlüsselrolle in der genomischen Signaltransduktion von Aldosteron ein. Wenn aber der MR, wie hier demonstriert, bereits durch die Hydrocortisonbehandlung herunterreguliert ist, erklärt dies ein Ausbleiben von MR-abhängigen aldosteronvermittelten Effekten. Die Bindung von Cortisol an dem MR steht in einem Konkurrenzverhältnis zu Aldosteron, welches über die 11- β -HSD-Isoformen reguliert wird. Dennoch ist wegen der deutlich höheren Konzentration von Cortisol auch bei intakter Enzymaktivität, eine Bindung von Cortisol an dem MR denkbar. Es wird vermutet, dass die Cortisolkonzentration auch bei Vorkommen der 11- β -HSD Typ 2 weiterhin 10 mal höher ist als die Aldosteronkonzentration (44).

Im Bereich der Neurologie sind der MR und der GR im Aspekt der Stressverarbeitung im Hippocampus im Blickpunkt. 2021 konnte gezeigt werden, dass der MR die Sensitivität des GR für Glukokortikoide über FKBP5 (ein Immunophilin Protein, spielt bei der Immunregulation eine Rolle) negativ beeinflussen kann. Auch Dexamethason konnte in Form einer *ultra-short negative feedback loop* die Expression von FKBP5 stimulieren. So wird ein Gleichgewicht zwischen beiden Rezeptoren bewahrt, welches für die Stressverarbeitung relevant ist (157). Es wurde des Weiteren demonstriert, dass Cortisol den GR negativ regulieren kann. Ob in der Gefäßmuskulatur ein ähnlicher Mechanismus zur Kontrolle der MR-Expression vorliegt, ist bisher nicht beschrieben.

Zelluläre Untersuchungen zum Hyperaldosteronismus, welche ohne eine Co-Stimulation mit Glukokortikoiden durchgeführt wurden, sollten wegen des hier gezeigten großen Einflusses von Hydrocortison auf den MR als kritisch betrachtet werden.

5.3.1.2.4. Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 - AGTR1

Auf der Grundlage bisheriger Veröffentlichungen ging man von einer Steigerung der AGTR1-Expression unter Aldosteron aus. DuPont et al. zeigten an Mäusen, dass im Alter die Dichte des MRs in den Widerstandsgefäßen zunimmt und dass die Expression des AT₁-Rezeptors über eine Reduktion der miRNA-155-Transkription gefördert wird (Disinhibition) (33). Dieses Phänomen steht im Zusammenhang mit einer erhöhten Vasokonstriktion und indirekt mit einer altersbedingten Hypertonie. Der AGTR1 und der MR haben bekanntermaßen eine enge Beziehung zueinander, welche in der Literatur als *cross-talk* beschrieben wird (158).

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde allerdings gezeigt, dass die Expression von AGTR1 unter Aldosteronbehandlung abnahm. Wie weiter oben dargestellt, wurde die MR-Expression durch Glukokortikoide reduziert. Nach DuPont et al. führt eine MR-Reduktion zu erhöhten miR-155-Leveln (33), daher könnte Aldosteron über diesen Mechanismus die AGTR1-Expression hemmen.

Im Gegensatz dazu wurde bereits 1985 an Rattenzellen gezeigt, dass die Behandlung mit Aldosteron die Bindungskapazität für AT-II, also die AT-II-Rezeptordichte in glatten Gefäßmuskulaturzellen erhöht (55). Die Zellkultur dauerte hier lediglich 18 Stunden an, sodass zu späteren Effekte keine Aussage getroffen werden kann. Des Weiteren wurde hier die Proteinbindung untersucht und nicht die RNA. Diskrepanzen zwischen mRNA und Protein sind beschrieben und können neben dem Verzicht auf Glukokortikoidbehandlung z.B. am Proteinturnover liegen (159).

5.3.1.3. Diskussion der Ergebnisse zu der EET-Signalkaskade

5.3.1.3.1. Der TRP-Kanal 4 der Vanilloid-Subfamilie -TRPV4

Das Vorkommen des TRPV4 Kanals in der Gefäßmuskulatur wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (72, 160) und konnte in den vorgestellten Experimenten bestätigt werden. Wegen der beschriebenen Interaktion mit der Signaltransduktion der EETs und der möglichen therapeutischen Möglichkeiten von sEH-Hemmern ist das Expressionsverhalten von TRPV4 unter Aldosteron interessant. Eine zeitabhängige Induktion der TRPV4-Expression nach 48 h konnte in der Tendenz bei fast allen Behandlungen gefunden werden, war aber nur mit 1 nM Aldosteron, Hydrocortison und der Kombination beider bei gleichzeitiger Eplerenonbehandlung statistisch signifikant.

In einem Tiermodell wurde 2018 gezeigt, dass Eplerenon u.a. über die Induktion von TRPV4 zu einer Abschwächung des durch Angiotensin-II gesteigerten myogenen Tonus in Hirngefäßen führte (75). Der Versuch von Diaz-Otero et. al wurde an Mäusen durchgeführt, welche für 4 Wochen ein mit Angiotensin II und Eplerenon angereichertes Futter bekamen. Auf der Grundlage der in diesem Versuch angewandten Methodik konnte die beobachteten TRPV4-Induktion rückwirkend nur indirekt auf eine MR-abhängige Signalkaskade zurückgeführt werden. Der direkte Aldosteroneffekt wurde nicht untersucht.

Da die zeitabhängige Induktion der TRPV4-Expression auch unter der Zugabe von Eplerenon zu beobachten war, konnte die vorliegende Arbeit keine MR-vermittelten Effekte aufzeigen.

In Sammelrohrzellen der Niere konnte eine fördernde Wirkung von 1 μ M Aldosteron nach 24 h auf die TRPV4-Expression beschrieben werden. Der Kanal ist in der Niere gemeinsam mit dem BK_{Ca}-Kanal für die Aufrechterhaltung der Plasmakaliumhomöostase essenziell. Die Untersuchungen basieren auch hier auf Untersuchungen mit Mäusen (74). Die Aldosteronkonzentration ist 1000-fach höher gewählt und wurde an einem anderen Zelltyp als VSMC untersucht. Diaz-Ortero et al. und Manenko et al. basieren ihre Aussagen auf Untersuchungen mit Mäusen. Es ist nicht auszuschließen, dass die TRPV4-Expression im Menschen anderen regulatorischen Mechanismen unterliegt als in Mäusen.

5.3.1.3.2. Die porenbildende Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals - KCNMA1

Die Expression der porenbildenden Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals konnte in allen Versuchen nachgewiesen werden. Zusätzlich stieg die KCNMA1-Expression mit längerer Behandlungszeit an. Dies zeigte sich bei der Kontrollbehandlung mit DMSO.

Die reine zeitliche Expressionssteigerung unter DMSO könnte der Serum starvation zuzuordnen sein, wie es bei ACTA2 und MYH11 bereits vermutet wurde. Dieser Befund tangiert jedoch nicht die weiteren Ergebnisse, da im folgenden nur Ergebnisse innerhalb der gleichen Behandlungszeit (48 h) verglichen wurden.

In der Literatur wird von einem hemmenden Einfluss von 100 nM Aldosteron auf die Expression von KCNMA1 in Gefäßmuskelzellen berichtet. In einem transgenen Mausmodell mit Überexpression der Aldosteronsynthase in den Kardiomyozyten konnte per qPCR eine reduzierte Expression von Kcnma1 und Kcnmb1 festgestellt werden. In vitro konnte eine Konzentrationsabhängige Abnahme der Kcnma1-Expression von glatten Muskelzellen der Ratte gezeigt werden, welche MR-abhängig war, da sie mit einem MR-Antagonisten (Spironolacton) verhindert werden konnte (83).

In den hier gezeigten Experimenten konnte durch 1 nM Aldosteron nur in Kombination mit Hydrocortison eine signifikante Hemmung der Expression demonstriert werden. Die isolierte Behandlung mit Aldosteron führte zu keiner Reduktion der KCNMA1-Expression. Aldosteron isoliert zu betrachten stellt eine unphysiologische Situation dar, weil – wie bereits dargestellt - eine MR-Transaktivierung durch Cortisol möglich ist. Aber umgekehrt ist bei in vivo-Experimenten keine isolierte Betrachtung von Aldosteron-Effekten möglich.

Es gibt in vivo Untersuchungen, welche ebenfalls keinen Einfluss von Aldosteron auf die KCNMA1-Expression feststellen konnten. So zeigte eine 14-tägige Aldosteronbehandlung von Mäusen keinen Einfluss auf die Kcnma1 und Kcnmb1 mRNA-Expression (145). In einem weiteren Mausmodell mit Aldosteron-Minipumpen und einer Behandlung über 4 Wochen konnte ebenfalls kein Einfluss auf die Kcnma1- und Kcnmb1-Expression gezeigt werden (161).

Hydrocortison zeigte einen eindeutig supprimierenden Effekt, der nicht durch Eplerenon aufgehoben wurde. Daher ist ein MR-vermittelter Effekt unwahrscheinlich. Durch den Anstieg der KCNMA1-Expression bei Behandlung mit Mifepriston handelt es eher sich um einen GR-vermittelten Effekt. Diese These bestätigte sich nicht uneingeschränkt, da sich die Expression mit Mifepriston nicht vollständig normalisiert darstellte. Eine Glukokortikoid-vermittelte Regulation des BK_{Ca} ist bisher nicht beschrieben, lässt sich jedoch aus Teilbefunden der Literatur herleiten: 2020 wurde eine Arbeit veröffentlicht, welche die NRF2-vermittelte Regulation (Transkriptionsfaktor) von KCNMA1 beschreibt (162). Glukokortikoide reduzieren die Proteinkonzentration von NRF2 (163), dies konnte auch für periadrenales Fettgewebe von Patienten mit einem Cortisol produzierenden Adenom gezeigt werden (164). Eine durch Cortisol induzierte NRF2-Suppression könnte demnach für die KCNMA1-Repression verantwortlich sein.

Die Zugabe von 14,15-EET zeigte einen supprimierenden Effekt auf die BK_{Ca}-Expression. Die Behandlung mit dem löslichen Epoxidhydrolasehemmer (GSK2256294) konnte die Expressionsreduktion wieder tendenziell normalisieren. Daher ist von einem hemmenden Effekt durch die 14,15-EET-Behandlung auf die KCNMA1-Expression auszugehen. Es ist gut vorstellbar, aber spekulativ, dass 14,15-DHET diese negativen Einflüsse bedingt. Die Epoxidhydrolasen wandeln EET in DHETs um. 14,15-DHET zeigte in humanen Koronararterien zumindest einen geringeren Effekt als 14,15-EET, (165). Ein Effekt von 14,15-DHET auf die KCNMA1-Expression ist bis dato nicht untersucht worden.

Die Herunterregulierung der KCNMA1-Expression unter Aldosteron mit physiologischem Hydrocortisonleveln wirft die Frage auf, wie sich die Expression bei dauerhaft erhöhtem Cortisol-Level verhält (z. B. Cushing-Syndrom) oder bei der Co-Sekretion von Gluko- und Mineralokortikoiden bei adrenalen Tumoren.

5.3.1.3.3. Epoxidhydrolasen – mEH und sEH

Das Vorkommen der Epoxidhydrolasen in der Zelle reguliert das Verhältnis von den aktiven EETs zu den weniger aktiven DHETs. EETs wirken in den Blutgefäßen vasodilatatorisch und entzündungshemmend (165, 166). Die Hemmung des Abbaus dieser Substanzen könnte eine neue Behandlungsform des primären Hyperaldosteronismus darstellen.

Um herauszufinden, in welchem Ausmaß Aldosteron auf die Enzyme mEH (Gencode: EPHX1) und sEH (Gencode: EPHX2) Einfluss nimmt, wurde die Expression beider Gene unter experimentellen Bedingungen gemessen.

Im Einklang mit den, in den Nierengefäßen gezeigten sEH in glatten Muskelzellen (167), konnten in den Versuchen die sEH konstant nachgewiesen werden. Nachdem die lösliche Epoxidhydrolase in der Literatur als Haupt-Isoenzym des EET-Metabolismus beschrieben wird (97) und die Blockade von sEH den Blutdruck reduziert (100), wurde hier die höhere Expressionsrate vermutet. Die Bedeutung von sEH im kardio-vaskulären System konnte in den vergangenen Jahren bereits verdeutlicht werden (168).

Im Gegenteil dazu zeigte die EPHX1 in den Gefäßmuskelzellen höhere Expressionsniveaus. Bei Untersuchungen von Mäusehirnen konnte das Vorkommen von mEH in den Blutgefäßen (Endothelzellen und glatten Muskelzellen) nachgewiesen werden, wohingegen die sEH fast ausschließlich in den Astrozyten gefunden wurden. Daher wird der mEH eine bisher unbekannte Bedeutung für die Regulation physiologischer Prozesse zugesprochen (169). Wegen der höheren Expression der mEH können wir diese Annahme unterstützen.

Der hemmende Einfluss von PDGF-BB auf die EPHX1-Expression war nach 24 h deutlich zu sehen, wohingegen Aldosteron und die anderen Behandlungen keinen Einfluss auf die Expression der mEH zeigten. Nach 48 h hatte PDGF-BB weiterhin die niedrigsten Expressionswerte, ein entscheidender pathologischer Effekt durch Aldosteron auf die mEH-Expression war nicht zu sehen.

Die EPHX2-Expression zeigte nur unter PDGF-BB einen signifikanten Anstieg über die Zeit. Dies steht im Einklang mit der Literatur, welche beschreibt, dass PDGF-BB die sEH-Expression konzentrations- und zeitabhängig fördert (144).

Bei Normierung der Ergebnisse nach 48 h auf die jeweiligen Ergebnisse nach 24 h fiel auf, dass die EPHX2-Expression nach 48 h unter Aldosteron (mit Hydrocortison) signifikant -und MR-abhängig- gegenüber 24 h gesteigert wurde. Die Absolutwerte der Expression unter Aldosteron und Hydrocortison zu beiden Zeitpunkten unterschieden jedoch nicht von denen der Hydrocortison-Kontrolle. Auf Basis dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass im Kontext eines primären Hyperaldosteronismus eine gesteigerten sEH-Expression unwahrscheinlich ist sich. Im Fettgewebe von Mäusen wurde hingegen eine Steigerung der Ephx2-Expression nach einer dreitägigen Aldosteronbehandlung festgestellt. Des Weiteren wurde bei PHA-Patienten eine MR-abhängige Regulation der EETs festgestellt. Akute Effekte von Aldosteron konnten nicht festgestellt werden (170). Es ist vorstellbar, dass sich in den zu diskutierenden Experimenten mit einer längeren Behandlungszeit stärkere und signifikante Effekte von Aldosteron auf EPHX1 und EPHX2 gezeigt hätten.

Auf der Grundlage der durchgeführten Experimente lässt sich jedoch nur annehmen, dass glatte Muskelzellen unter Aldosteronexzess für 24 h und 48 h mit den gezeigten mRNA-Expressionslevels (unter der Voraussetzung einer unbeeinträchtigten Proteintranslation) wahrscheinlich keine gesteigerte Metabolisierung der EETs über mEH oder sEH aufweisen.

5.3.2. Diskussion der Ergebnisse des Western-Blots

Der Western-Blot wurde unterstützend zu den qPCR-Ergebnissen der KCNMA1-Expression unter Hydrocortison und Aldosteron durchgeführt. Die signifikanten Unterschiede in der Expression bei den unterschiedlichen Behandlungen konnten auf der Ebene der Proteine nicht bestätigt werden.

Eine Möglichkeit diese Diskrepanz zu erklären, ist die Methodik. Die qPCR kann bereits sehr geringe Unterschiede detektieren, welche sich in diesem Maße noch nicht auf dem Proteinniveau äußern. Die ausbleibenden signifikanten Änderungen könnte aber auch darin begründet sein, dass das semiquantitative Verfahren des Western-Blots nicht empfindlich genug ist. Auch bringt das aus vielen aufeinander aufbauenden Arbeitsschritten bestehende Verfahren viele „Stolpersteine“ (171).

Andere Gruppen konnten aldosteronabhängige Änderungen des Proteins nachweisen. Ambroisine et al. zeigten im Western-Blot, dass Mäuse mit einer erhöhten Aldosteron Synthese in Kardiomyozyten eine signifikante Reduktion der α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals im Herzen aufweisen (83). Im Unterschied zu dieser Arbeit handelt es bei dem beschriebenen Western-Blot demnach um Tierzellen und speziell um Kardiomyozyten. Ein Nachweis auf Proteinebene mit VSMCs erfolgte nicht. Es bleibt unklar, auf welchen Zelltyp die Expression zurückzuführen ist, da der Western-Blot aus Membranfraktionen des gesamten Herzens durchgeführt wurde. Auch wurde die genaue ortsständige Aldosteronkonzentration, mit der die glatten Muskelzellen lokal stimuliert wurden, in der Studie von Ambroisine et al. nicht bestimmt.

Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikante Beeinflussung der KCNMA1-Expression durch Aldosteron auf mRNA-Ebene. Ein Erklärungsversuch ist die Diskrepanz zwischen mRNA und dem Protein. Der Weg von der mRNA zum Ionenkanal unterliegt mehreren Kontrollmechanismen welche den Turnover bestimmen (159). Für die BK_{Ca}- α -Untereinheit gibt es bisher keine Untersuchungen zu der spezifischen Geschwindigkeit des Turnovers.

Zusammenfassend deutet das Ergebnis des Western-Blots auf keine funktionale Änderung der α -Untereinheit des BK_{Ca}-Kanals in VSMC durch Aldosteron im Vergleich zu Hydrocortison hin.

5.3.3. Diskussion der Kalzium-Bildgebung

Zur Untersuchung der Funktion von den Gefäßmuskelzellen unter Aldosteron-Exzess wurde die intrazelluläre Kalziumdynamik auf EET-Stimulation untersucht. Der Kalziumanstieg auf 14,15-EET war in der Kontroll- und in der Aldosteron-Gruppe unverändert. Zusätzlich konnte keine erhöhte Spontanaktivität, gemessen an der Frequenz von intrazellulären Kalziumpeaks, durch eine Behandlung der Zellen mit Aldosteron nachgewiesen werden. Nur unter der Eplerenon-Behandlung zeigte sich ein signifikant erniedrigter Kalziumanstieg, verglichen mit der Kontrollgruppe.

Bereits 1999 haben Fang et al. die Wirkung von EETs auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Gefäßmuskelzellen untersucht. Ihre Ergebnisse zeigten einen Kalziumanstieg unter allen EET-Regioisomeren (172). Behandlungen mit 14,15-EET bewirkten eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration mit Werten von etwa 300 nM. Diese intrazellulären Kalziumkonzentrationen sind mit den Messungen in den Experimenten der vorliegenden Arbeit vergleichbar (Kalzium-Peak der Hydrocortison-Kontrollgruppe auf 14,15-EET: 353 ± 57 nM). Die erwähnte Arbeit von Fang et al. konnte ferner zeigen, dass der Kalziumanstieg durch einen Einstrom von Extrazellulär bedingt war und dass er sich durch einen LTCC-Blocker, Verapamil, antagonisieren ließ. Die glattmuskuläre Kontraktion wurde in Abhängigkeit vom Stimulus der Vorkontraktion entweder gesteigert oder reduziert. Der *store-operated calcium entry* (SOCE) war unabhängig von einer vorherigen Applikation von 14,15-EET. Nach diesen Ergebnissen verursachen EETs im glatten Muskel einen Einstrom von Kalzium über LTCC in Abhängigkeit von der Vorkontraktion und lassen die Kalziumspeicher unbeeinträchtigt.

Earley und Kollegen hingegen beschrieben, dass 11,12-EET über eine Aktivierung von TRPV4-Kanälen und Ryanodinrezeptoren Kalziumsparks generierte, die unabhängig von LTCC zustande kamen und für die Vasodilatation durch BK_{Ca}-Kanäle entscheidend waren. Nach dieser Arbeit wirken EETs auf den Komplex an Kanälen, die eng mit dem Kalziumspeicher des sarkoplasmatischen Retikulums assoziiert sind (72). An dieser Stelle muss festgehalten werden, dass Fang und Kollegen EET-Konzentrationen im mikromolaren Konzentrationsbereich verwendeten, um per Fura2 Änderungen im globalen zellulären Kalzium detektieren zu können. Earley und Mitarbeiter konnten im nanomolaren Bereich arbeiten, weil ihre Technik subzelluläre Kalziumanstiege auflösen konnte. Möglicherweise widersprechen sich damit die beiden Arbeiten nicht und die Kalziumanstiege führen im nanomolaren Bereich zu Sparks und zu globalen Kalziumanstiegen im mikromolaren EET-Konzentrationsbereich.

Es gibt bereits Untersuchungen mit humanen Bronchialzellen, welche zeigen, dass 14,15-EET die Kalziumsensitivität in den Zellen reduzieren. 14,15-EET verringert die Phosphorylierung von *Myosin Phosphatase Inhibitor Protein (CPI-17)*, so wird die Phosphorylierung der *Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP)* über eine verminderte Aktivität der Protein Kinase C (PKC) reduziert (173). Dadurch reduziert sich die Kontraktion unter Einfluss von 14,15-EET. Dies könnte erklären, warum EETs trotz intrazellulärem Kalziumanstieg relaxierend auf VSMCs wirken.

Von allen Vorbehandlungen zeigte sich nur in der Eplerenon-behandelten Gruppe ein verminderter Kalziumanstieg auf EET-Stimulation. Als Erklärung für die niedrigeren Kalziumantworten in Eplerenon-behandelten Zellen käme z.B. eine niedrigere Expression von LTCC in Frage. In gealterten, VSMC-spezifischen *MR-knock-out*-Mäusen konnte ein reduzierter myogener Tonus, eine reduzierte Agonisten-abhängige Kontraktion und eine reduzierte Expression sowie Aktivität des LTCC festgestellt werden (32). Des Weiteren zeigte die Gruppe um Iris Z. Jaffe, dass der MR bei gealterten Mäusen die miR155 reduziert und sich so auch die LTCC-Expression reduziert (33). Daher könnte man auf eine MR-abhängige Regulation (zB. Blockade des MR über Eplerenon) der CACNA1C-Expression schließen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit in der qPCR nicht bestätigt werden. Die CACNA1C-Expression zeigte sich durch die Behandlung nicht verändert. Ein weiterer Ansatz sind die Effekte von Eplerenon an Pannexin-1-Kanälen, welche die reduzierte Kalziumantwort erklären würden. Bei Spironolacton und anderen steroidal MR-Antagonisten ist die Off-target-Hemmung von Pannexin-1-Kanälen in einer MR-unabhängigen Weise bekannt (174). Pannexin-1-Kanäle sind mit α 1D-adrenergen Rezeptoren assoziiert, welche bei der Muskelkontraktion von VSMC (G_q -vermittelter Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration) eine Rolle spielen (175). Demnach wäre es eine Möglichkeit, dass der EET-bedingte Kalziumanstieg ebenfalls einer Augmentierung durch Pannexin-1-Kanäle unterliegt und entsprechend bei mit Eplerenon vorbehandelten Zellen gehemmt wird. Dieser Zusammenhang ist bisher aber nicht untersucht worden, so dass die Erklärung spekulativ ist.

Spontane rhythmische und intrinsische Aktivität von arteriellen Mikrogefäßen wird als Vasomotion bezeichnet. Hypothesen zur Rolle von Vasomotion umfassen eine in Summe besseren Perfusion des nachgeschalteten Gewebes als bei konstantem Gefäßdurchmesser (176). Arterien aus mit dem Mineralokortikoid DOCA behandelten Ratten, weisen eine erhöhte Frequenz von Vasomotion auf (177). Als zugrundeliegendes Substrat können u.a. spontane Kalziumtransienten der glatten Muskelzellen angenommen werden. Es wird spekuliert, dass in der erhöhten Vasomotion eine protektive Adaptation auf die durch Hypertonie bedingte kapilläre Rarefizierung vorliegt, die das Gewebe vor Ischämie schützt (176).

In der vorliegenden Studie konnte jedoch kein Einfluss einer Vorbehandlung mit Aldosteron auf die Spontanaktivität der glatten Muskelzellen gezeigt werden. Der wesentliche Unterschied zu der zuvor erwähnten DOCA-Studie besteht sicher in der Tatsache, dass es diese eine *in vivo*-Studien war, in denen u.a. hämodynamische Faktoren auf die glatten Muskelzellen einwirken konnten: Auch der Blutdruck selber kann wohl die Vasomotion verstärken (176).

Bezüglich der den Transienten wahrscheinlich zugrundeliegenden Kanäle gab es, wie bereits diskutiert keine transkriptionellen Einflüsse von Aldosteron auf den CACNA1C, welche einen Hinweis auf eine durch Aldosteron induzierte veränderte Proteinmenge des LTCC hätten geben können. Die funktionellen Ergebnisse bestätigen daher die qPCR-Ergebnisse von CACNA1C und TRPV4.

Es konnte zusammenfassend kein funktioneller Einfluss von Aldosteron auf die zelluläre Kalziumantwort auf Stimulation mit 14,15-EET festgestellt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Delorme P, Genest J. Primary Aldosteronism *: A Review of Medical Literature from 1955 to June 1958. *Can Med Assoc J* 1959; 81(11):893–902.
2. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H et al. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101(5):1889–916. doi: 10.1210/jc.2015-4061.
3. Neuhauser HK, Adler C, Rosario AS, Diederichs C, Ellert U. Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in Germany 1998 and 2008-11. *Journal of human hypertension* 2015; 29(4):247–53. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25273858/>.
4. Monticone S, Burrello J, Tizzani D, Bertello C, Viola A, Buffolo F et al. Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69(14):1811–20.
5. Williams TA, Lenders JWM, Mulatero P, Burrello J, Rottenkolber M, Adolf C et al. Outcomes after adrenalectomy for unilateral primary aldosteronism: an international consensus on outcome measures and analysis of remission rates in an international cohort. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2017; 5(9):689–99.
6. Milliez P, Girerd X, Plouin P-F, Blacher J, Safar ME, Mourad J-J. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(8):1243–8.
7. Savard S, Amar L, Plouin P-F, Steichen O. Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension* 2013; 62(2):331–6.
8. Reincke M, Fischer E, Gerum S, Merkle K, Schulz S, Pallauf A et al. Observational study mortality in treated primary aldosteronism: the German Conn's registry. *Hypertension* 2012; 60(3):618–24.
9. Monticone S, D'Ascenzo F, Moretti C, Williams TA, Veglio F, Gaita F et al. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2018; 6(1):41–50.
10. Wu X, Yu J, Tian H. Cardiovascular risk in primary aldosteronism: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 2019; 98(26):e15985.
11. Ohno Y, Sone M, Inagaki N, Yamasaki T, Ogawa O, Takeda Y et al. Prevalence of Cardiovascular Disease and Its Risk Factors in Primary Aldosteronism: A Multicenter Study in Japan. *Hypertension* 2018; 71(3):530–7.
12. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 75(3):487–517.
13. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84(3):767–801.
14. Yang X, Dong M, Wen H, Liu X, Zhang M, Ma L et al. MiR-26a contributes to the PDGF-BB-induced phenotypic switch of vascular smooth muscle cells by suppressing Smad1. *Oncotarget* 2017; 8(44):75844–53.

15. Blank RS, Owens GK. Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1990; 142(3):635–42.
16. Miano JM, Long X, Fujiwara K. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(1):C70-81.
17. Long X, Bell RD, Gerthoffer WT, Zlokovic BV, Miano JM. Myocardin is sufficient for a smooth muscle-like contractile phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(8):1505–10. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.166066.
18. Wang Z, Wang D-Z, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A, Olson EN. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 2004; 428(6979):185–9.
19. Liu Y, Sinha S, McDonald OG, Shang Y, Hoofnagle MH, Owens GK. Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J Biol Chem* 2005; 280(10):9719–27. doi: 10.1074/jbc.M412862200.
20. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31(1):13–20.
21. Fatigati V, Murphy RA. Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem* 1984; 259(23):14383–8.
22. Owens GK, Rabinovitch PS, Schwartz SM. Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(12):7759–63.
23. Frid MG, Printesva OY, Chiavegato A, Faggini E, Scatena M, Koteliansky VE et al. Myosin heavy-chain isoform composition and distribution in developing and adult human aortic smooth muscle. *J Vasc Res* 1993; 30(5):279–92. doi: 10.1159/000159007.
24. Giachelli CM, Schwartz SM, Liaw L. Molecular and cellular biology of osteopontin. *Trends in Cardiovascular Medicine* 1995; 5(3):88–95.
25. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19(5-6):333–45.
26. Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EAG et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283(5):H1802-10.
27. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4):411–25. doi: 10.1124/pr.57.4.5.
28. Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, Wegener JW. L-type CaV1.2 calcium channels: from in vitro findings to in vivo function. *Physiol Rev* 2014; 94(1):303–26. doi: 10.1152/physrev.00016.2013.
29. Murthy KS. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* 2006; 68:345–74. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040504.094707.
30. Gollasch M, Haase H, Ried C, Lindschau C, Morano I, Luft FC et al. L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *The FASEB Journal* 1998; 12(7):593–601.
31. Wamhoff BR, Bowles DK, McDonald OG, Sinha S, Somlyo AP, Somlyo AV et al. L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circ Res* 2004; 95(4):406–14.

32. McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nature Medicine* 2012; 18(9):1429–33.
33. DuPont JJ, McCurley A, Davel AP, McCarthy J, Bender SB, Hong K et al. Vascular mineralocorticoid receptor regulates microRNA-155 to promote vasoconstriction and rising blood pressure with aging. *JCI Insight* 2016; 1(14):e88942. Verfügbar unter: <https://insight.jci.org/articles/view/88942>.
34. Tarjus A, Belozertseva E, Louis H, El Moghrabi S, Labat C, Lacolley P et al. Role of smooth muscle cell mineralocorticoid receptor in vascular tone. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2015; 467(8):1643–50.
35. Mesquita TR, Auguste G, Falcón D, Ruiz-Hurtado G, Salazar-Enciso R, Sabourin J et al. Specific Activation of the Alternative Cardiac Promoter of *Cacna1c* by the Mineralocorticoid Receptor. *Circ Res* 2018; 122(7):e49-e61.
36. SIMPSON SA, TAIT JF, WETTSTEIN A, NEHER R, EUW J von, REICHSTEIN T. Isolierung eines neuen kristallisierten Hormons aus Nebennieren mit besonders hoher Wirksamkeit auf den Mineralstoffwechsel. *Experientia* 1953; 9(9):333–5.
37. Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol* 1988; 50:409–26.
38. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 2004; 84(2):489–539. doi: 10.1152/physrev.00030.2003.
39. Tsuchiya K, Yoshimoto T, Hirata Y. Endothelial dysfunction is related to aldosterone excess and raised blood pressure. *Endocr J* 2009; 56(4):553–9. doi: 10.1507/endocrj.k09e-014.
40. Chou C-H, Chen Y-H, Hung C-S, Chang Y-Y, Tzeng Y-L, Wu X-M et al. Aldosterone Impairs Vascular Smooth Muscle Function: From Clinical to Bench Research. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(11):4339–47. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26401591/>.
41. Fejes-Tóth G, Pearce D, Náray-Fejes-Tóth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(6):2973–8. doi: 10.1073/pnas.95.6.2973.
42. Lösel R, Feuring M, Wehling M. Non-genomic aldosterone action: from the cell membrane to human physiology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 83(1-5):167–71.
43. Verhovez A, Williams T, Monticone S, Crudo V, Burrello J, Galmozzi M et al. Genomic and Non-genomic Effects of Aldosterone. *CST* 2012; 7(2):132–41.
44. Funder JW. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors–Physiology and Pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2017; 18(5). doi: 10.3390/ijms18051032.
45. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987; 237(4812):268–75.
46. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 1988; 242(4878):583–5.
47. Mihailidou AS, Loan Le TY, Mardini M, Funder JW. Glucocorticoids activate cardiac mineralocorticoid receptors during experimental myocardial infarction. *Hypertension* 2009; 54(6):1306–12. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.136242.
48. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Campbell J. Vascular type I aldosterone binding sites are physiological mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 1989; 125(4):2224–6.

49. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 1999; 341(10):709–17. doi: 10.1056/NEJM199909023411001.
50. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003; 348(14):1309–21. doi: 10.1056/NEJMo030207.
51. Yan Y, Wang C, Lu Y, Gong H, Wu Z, Ma X et al. Mineralocorticoid receptor antagonism protects the aorta from vascular smooth muscle cell proliferation and collagen deposition in a rat model of adrenal aldosterone-producing adenoma. *J Physiol Biochem* 2018; 74(1):17–24.
52. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, El Moghrabi S, Ouvrard-Pascaud A, Berger S et al. Smooth Muscle Cell Mineralocorticoid Receptors Are Mandatory for Aldosterone–Salt to Induce Vascular Stiffness. *Hypertension* 2013; 63(3):520–6.
53. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation* 2004; 109(18):2213–20. doi: 10.1161/01.CIR.0000127949.05756.9D.
54. Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci* 2007; 112(8):417–28. doi: 10.1042/CS20060342.
55. Schiffrin EL, Franks DJ, Gutkowska J. Effect of aldosterone on vascular angiotensin II receptors in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63(12):1522–7.
56. Jaffe IZ, Mendelsohn ME. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2005; 96(6):643–50. doi: 10.1161/01.RES.0000159937.05502.d1.
57. Rossier BC, Baker ME, Studer RA. Epithelial sodium transport and its control by aldosterone: the story of our internal environment revisited. *Physiol Rev* 2015; 95(1):297–340. doi: 10.1152/physrev.00011.2014.
58. Canessa CM, Merillat AM, Rossier BC. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. *Am J Physiol* 1994; 267(6 Pt 1):C1682–90. doi: 10.1152/ajpcell.1994.267.6.C1682.
59. Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y et al. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 1995; 11(1):76–82. doi: 10.1038/ng0995-76.
60. Riepe FG. Clinical and molecular features of type 1 pseudohypoaldosteronism. *Horm Res* 2009; 72(1):1–9. doi: 10.1159/000224334.
61. Downs CA, Johnson NM, Coca C, Helms MN. Angiotensin II regulates δ -ENaC in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 2018; 116:26–33. doi: 10.1016/j.mvr.2017.10.001.
62. Drüppel V, Kusche-Vihrog K, Grossmann C, Gekle M, Kasprzak B, Brand E et al. Long-term application of the aldosterone antagonist spironolactone prevents stiff endothelial cell syndrome. *The FASEB Journal* 2013; 27(9):3652–9. doi: 10.1096/fj.13-228312.
63. Drummond HA, Gebremedhin D, Harder DR. Degenerin/epithelial Na⁺ channel proteins: components of a vascular mechanosensor. *Hypertension* 2004; 44(5):643–8. doi: 10.1161/01.HYP.0000144465.56360.ad.

64. Jernigan NL, Drummond HA. Vascular ENaC proteins are required for renal myogenic constriction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(4):F891-901. doi: 10.1152/ajprenal.00019.2005.
65. Jernigan NL, Drummond HA. Myogenic vasoconstriction in mouse renal interlobar arteries: role of endogenous beta and gamma ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291(6):F1184-91. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16849693/>.
66. Drummond HA, Grifoni SC, Jernigan NL. A new trick for an old dogma: ENaC proteins as mechanotransducers in vascular smooth muscle. *Physiology (Bethesda)* 2008; 23:23–31. doi: 10.1152/physiol.00034.2007.
67. Drummond HA. β ENaC is a molecular component of a VSMC mechanotransducer that contributes to renal blood flow regulation, protection from renal injury, and hypertension. *Front Physiol* 2012; 3:341. doi: 10.3389/fphys.2012.00341.
68. Chung W-S, Weissman JL, Farley J, Drummond HA. β ENaC is required for whole cell mechanically gated currents in renal vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2013; 304(12):F1428-F1437. doi: 10.1152/ajprenal.00444.2012.
69. Chambers L, Dorrance AM. Regulation of ion channels in the microcirculation by mineralocorticoid receptor activation. *Curr Top Membr* 2020; 85:151–85.
70. Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2005; 57(4):427–50. doi: 10.1124/pr.57.4.6.
71. Filosa JA, Yao X, Rath G. TRPV4 and the regulation of vascular tone. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013; 61(2):113–9. doi: 10.1097/FJC.0b013e318279ba42.
72. Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE. TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circ Res* 2005; 97(12):1270–9. doi: 10.1161/01.RES.0000194321.60300.d6.
73. Darby WG, Grace MS, Baratchi S, McIntyre P. Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2016; 78:217–28. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272516301844>.
74. Mamenko MV, Boukelmoune N, Tomilin VN, Zaika OL, Jensen VB, O'Neil RG et al. The renal TRPV4 channel is essential for adaptation to increased dietary potassium. *Kidney international* 2017; 91(6):1398–409. doi: 10.1016/j.kint.2016.12.010.
75. Diaz-Otero JM, Yen T-C, Fisher C, Bota D, Jackson WF, Dorrance AM. Mineralocorticoid receptor antagonism improves parenchymal arteriole dilation via a TRPV4-dependent mechanism and prevents cognitive dysfunction in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; 315(5):H1304-H1315. doi: 10.1152/ajpheart.00207.2018.
76. Knaus H-G, Eberhart A, Glossmann H, Munujos P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal* 1994; 6(8):861–70.
77. Lee US, Cui J. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends Neurosci* 2010; 33(9):415–23. doi: 10.1016/j.tins.2010.06.004.
78. Talukder G, Aldrich RW. Complex Voltage-Dependent Behavior of Single Unliganded Calcium-Sensitive Potassium Channels. *Biophysical Journal* 2000; 78(2):761–72. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76634-3.
79. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana LF, Bonev AD, Knot HJ et al. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995; 270(5236):633–7.

80. Nelson MT, Brayden JE. Regulation of arterial tone by calcium-dependent K⁺ channels and ATP-sensitive K⁺ channels. *Cardiovasc Drug Ther* 1993; 7 Suppl 3(3):605–10. Verfügbar unter: <https://link-springer-com.emedien.uni-muenchen.de/article/10.1007/BF00877627>.
81. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:69–78.
82. Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou X-B, Sausbier U et al. Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 2005; 112(1):60–8. doi: 10.1161/01.CIR.0000156448.74296.FE.
83. Ambroisine M-L, Favre J, Oliviero P, Rodriguez C, Gao J, Thuillez C et al. Aldosterone-induced coronary dysfunction in transgenic mice involves the calcium-activated potassium (BKCa) channels of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2007; 116(21):2435–43.
84. Furchgott RF. The Discovery of Endothelium-Derived Relaxing Factor and Its Importance in the Identification of Nitric Oxide. *JAMA* 1996; 276(14):1186.
85. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflgers Archiv European Journal of Physiology* 2010; 459(6):881–95.
86. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ Res* 1996; 78(3):415–23. doi: 10.1161/01.RES.78.3.415.
87. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 2001; 276(39):36059–62. doi: 10.1074/jbc.R100030200.
88. Fisslthaler B, Popp R, Michaelis UR, Kiss L, Fleming I, Busse R. Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Hypertension* 2001; 38(6):1427–32. doi: 10.1161/hy1201.096532.
89. Imig JD. Epoxyeicosatrienoic Acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid on Endothelial and Vascular Function. *Adv Pharmacol* 2016; 77:105–41. doi: 10.1016/bs.apha.2016.04.003.
90. Campbell WB, Deeter C, Gauthier KM, Ingraham RH, Falck JR, Li P-L. 14,15-Dihydroxyeicosatrienoic acid relaxes bovine coronary arteries by activation of K(Ca) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(5):H1656–64. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11959628/>.
91. Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, McMurtry S, Kim DH et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in human internal mammary artery is 11,12-epoxyeicosatrienoic acid and causes relaxation by activating smooth muscle BK(Ca) channels. *Circulation* 2003; 107(5):769–76. doi: 10.1161/01.cir.0000047278.28407.c2.
92. Berna-Erro A, Izquierdo-Serra M, Sepúlveda RV, Rubio-Moscardo F, Doñate-Macián P, Serra SA et al. Structural determinants of 5',6'-epoxyeicosatrienoic acid binding to and activation of TRPV4 channel. *Sci Rep* 2017; 7(1):10522. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-11274-1>.
93. Ellinsworth DC, Earley S, Murphy TV, Sandow SL. Endothelial control of vasodilation: integration of myoendothelial microdomain signalling and modulation by epoxyeicosatrienoic acids. *Pflgers Archiv European Journal of Physiology* 2014; 466(3):389–405. doi: 10.1007/s00424-013-1303-3.
94. Itoh T, Seki N, Suzuki S, Ito S, Kajikuri J, Kuriyama H. Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol 1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. *J Physiol (Lond)* 1992; 451:307–28. doi: 10.1113/jphysiol.1992.sp019166.

95. Morisseau C, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53:37–58. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140244.
96. Spector AA, Norris AW. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(3):C996-1012. doi: 10.1152/ajpcell.00402.2006.
97. Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progress in Lipid Research* 2004; 43(1):55–90. doi: 10.1016/S0163-7827(03)00049-3.
98. Fornage M, Boerwinkle E, Doris PA, Jacobs D, Liu K, Wong ND. Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. *Circulation* 2004; 109(3):335–9.
99. Craig R. Lee, Kari E. North, Molly S. Bray, Myriam Fornage, John M. Seubert, John W. Newman, Bruce D. Hammock, David J. Couper, Gerardo Heiss, and Darryl C. Zeldin. Genetic variation in soluble epoxide hydrolase EPHX2 and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Hum Mol Genet* 2006; (15(10)):1640–9.
100. Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW et al. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res* 2000; 87(11):992–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11090543/>.
101. Imig JD, Zhao X, Capdevila JH, Morisseau C, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension* 2002; 39(2 Pt 2):690–4. doi: 10.1161/hy0202.103788.
102. Imig JD, Zhao X, Zaharis CZ, Olearczyk JJ, Pollock DM, Newman JW et al. An orally active epoxide hydrolase inhibitor lowers blood pressure and provides renal protection in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2005; 46(4):975–81. doi: 10.1161/01.HYP.0000176237.74820.75.
103. Oni-Orisan A, Edin ML, Lee JA, Wells MA, Christensen ES, Vendrov KC et al. Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids and coronary artery disease in humans: a targeted metabolomics study. *J Lipid Res* 2016; 57(1):109–19. doi: 10.1194/jlr.M061697.
104. Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(10):794–805. doi: 10.1038/nrd2875.
105. Liu P, Zhang S, Gao J, Lin Y, Shi G, He W et al. Downregulated Serum 14, 15-Epoxyeicosatrienoic Acid Is Associated With Abdominal Aortic Calcification in Patients With Primary Aldosteronism. *Hypertension* 2018; 71(4):592–8.
106. Loch D, Hoey A, Morisseau C, Hammock BO, Brown L. Prevention of hypertension in DOCA-salt rats by an inhibitor of soluble epoxide hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 2007; 47(1):87–98.
107. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006; 1(3):1559–82. doi: 10.1038/nprot.2006.236.
108. Geyer RL, Koshland DE. The Molecule of the Year. *Science* 1989; 246(4937):1543–6.
109. 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):402–8.
110. M.W. Pfaffl und H.H.D. Meyer. Quantifizierung der mRNA-Expression von Kandidatengenen in Nutztieren mittels qRT-PCR. *Züchtungsurkunde* 2006; (78):440–50.

111. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64(15):5245–50.
112. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260(6):3440–50.
113. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods* 2008; 46(3):143–51. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.09.025.
114. Godfrey V, Martin AL, Struthers AD, Lyles GA. Effects of aldosterone and related steroids on LPS-induced increased expression of inducible NOS in rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2011; 164(8):2003–14.
115. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S et al. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension* 2005; 45(4):773–9.
116. Maron BA, Zhang Y-Y, Handy DE, Beuve A, Tang S-S, Loscalzo J et al. Aldosterone increases oxidant stress to impair guanylyl cyclase activity by cysteinyl thiol oxidation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2009; 284(12):7665–72.
117. Hao J, Zhang L, Cong G, Ren L, Hao L. MicroRNA-34b/c inhibits aldosterone-induced vascular smooth muscle cell calcification via a SATB2/Runx2 pathway. *Cell Tissue Res* 2016; 366(3):733–46.
118. Heinrich DA, Adolf C, Rump LC, Quack I, Quinkler M, Hahner S et al. Primary aldosteronism: key characteristics at diagnosis: a trend toward milder forms. *Eur J Endocrinol* 2018; 178(6):605–11.
119. Rogerson FM, Yao Y, Smith BJ, Fuller PJ. Differences in the determinants of eplerenone, spironolactone and aldosterone binding to the mineralocorticoid receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31(10):704–9. doi: 10.1111/j.1440-1681.2004.04079.x.
120. Hu X, Li S, McMahan EG, Lala DS, Rudolph AE. Molecular mechanisms of mineralocorticoid receptor antagonism by eplerenone. *Mini Rev Med Chem* 2005; 5(8):709–18. doi: 10.2174/1389557054553811.
121. Nakamura Y, Suzuki S, Suzuki T, Ono K, Miura I, Satoh F et al. MDM2: a novel mineralocorticoid-responsive gene involved in aldosterone-induced human vascular structural remodeling. *Am J Pathol* 2006; 169(2):362–71. doi: 10.2353/ajpath.2006.051351.
122. Miyata Y, Muto S, Kusano E. Mechanisms for nongenomic and genomic effects of aldosterone on Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 2005; 23(12):2237–50. doi: 10.1097/01.hjh.0000194122.27475.6c.
123. Liu H-S, Hsu P-Y, Lai M-D, Chang H-Y, Ho C-L, Cheng H-L et al. An unusual function of RON receptor tyrosine kinase as a transcriptional regulator in cooperation with EGFR in human cancer cells. *Carcinogenesis* 2010; 31(8):1456–64. doi: 10.1093/carcin/bgq100.
124. Rashid M-U, Coombs KM. Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *J Cell Physiol* 2019; 234(6):7718–24. doi: 10.1002/jcp.27890.
125. Nomura S, Fujitaka M, Sakura N, Ueda K. Circadian rhythms in plasma cortisone and cortisol and the cortisone/cortisol ratio. *Clinica Chimica Acta* 1997; 266(2):83–91. doi: 10.1016/S0009-8981(97)00142-3.
126. van Cauter E. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(7):2468–73. doi: 10.1210/jc.81.7.2468.

127. HATAKEYAMA H, INABA S, MIYAMORI I. 11.BETA.-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Hypertens Res* 2001; 24(1):33–7.
128. Blank RS, Owens GK. Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1990; 142(3):635–42.
129. Holycross BJ, Blank RS, Thompson MM, Peach MJ, Owens GK. Platelet-derived growth factor-BB-induced suppression of smooth muscle cell differentiation. *Circ Res* 1992; 71(6):1525–32. doi: 10.1161/01.res.71.6.1525.
130. Tharp DL, Wamhoff BR, Turk JR, Bowles DK. Upregulation of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel (IKCa1) mediates phenotypic modulation of coronary smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(5):H2493-503. doi: 10.1152/ajpheart.01254.2005.
131. Ma X, Wang Y, Stephens NL. Serum deprivation induces a unique hypercontractile phenotype of cultured smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; 274(5):C1206-14. doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.5.C1206.
132. Corjay MH, Thompson MM, Lynch KR, Owens GK. Differential effect of platelet-derived growth factor- versus serum-induced growth on smooth muscle alpha-actin and nonmuscle beta-actin mRNA expression in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1989; 264(18):10501–6.
133. Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(5):353–65. doi: 10.1038/nrm2890.
134. Goikuria H, Freijo MDM, Vega Manrique R, Sastre M, Elizagaray E, Lorenzo A et al. Characterization of Carotid Smooth Muscle Cells during Phenotypic Transition. *Cells* 2018; 7(3). doi: 10.3390/cells7030023.
135. Itoh S, Katoh Y, Konishi H, Takaya N, Kimura T, Periasamy M et al. Nitric Oxide Regulates Smooth-muscle-specific Myosin Heavy Chain Gene Expression at the Transcriptional Level—Possible Role of SRF and YY1 Through CARG Element. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2001; 33(1):95–107.
136. McDonald OG, Wamhoff BR, Hoofnagle MH, Owens GK. Control of SRF binding to CARG box chromatin regulates smooth muscle gene expression in vivo. *J Clin Invest* 2006; 116(1):36–48. Verfügbar unter: <https://www.jci.org/articles/view/26505>.
137. Mooradian DL, Hutsell TC, Keefer LK. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25(4):674–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7596138/>.
138. Jaffe IZ, Newfell BG, Aronovitz M, Mohammad NN, McGraw AP, Perreault RE et al. Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(11):3891–900.
139. Wang Y, Zhong B, Wu Q, Zhu T, Wang Y, Zhang M. Aldosterone Contributed to Pulmonary Arterial Hypertension Development via Stimulating Aquaporin Expression and Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells Proliferation. *Pharmacology* 2020; 105(7-8):405–15.
140. Shaul PW, Magness RR, Muntz KH, DeBeltz D, Buja LM. Alpha 1-adrenergic receptors in pulmonary and systemic vascular smooth muscle. Alterations with development and pregnancy. *Circ Res* 1990; 67(5):1193–200. doi: 10.1161/01.res.67.5.1193.
141. Min L-J, Mogi M, Li J-M, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005; 97(5):434–42. doi: 10.1161/01.RES.0000180753.63183.95.

142. Cascella T, Radhakrishnan Y, Maile LA, Busby WH, Gollahon K, Colao A et al. Aldosterone enhances IGF-I-mediated signaling and biological function in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2010; 151(12):5851–64. doi: 10.1210/en.2010-0350.
143. Kiyosue A, Nagata D, Myojo M, Sato T, Takahashi M, Satonaka H et al. Aldosterone-induced osteopontin gene transcription in vascular smooth muscle cells involves glucocorticoid response element. *Hypertens Res* 2011; 34(12):1283–7.
144. Wang Q, Huo L, He J, Ding W, Su H, Tian D et al. Soluble epoxide hydrolase is involved in the development of atherosclerosis and arterial neointima formation by regulating smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 309(11):H1894-903.
145. Briet M, Barhoumi T, Mian MOR, Coelho SC, Ouerd S, Rautureau Y et al. Aldosterone-Induced Vascular Remodeling and Endothelial Dysfunction Require Functional Angiotensin Type 1a Receptors. *Hypertension* 2016; 67(5):897–905. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.07074.
146. Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic Enzyme Gene Expression in the Human Heart 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(7):2519–25.
147. Carvajal CA, Tapia-Castillo A, Vecchiola A, Baudrand R, Fardella CE. Classic and Nonclassic Apparent Mineralocorticoid Excess Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105(4). doi: 10.1210/clinem/dgz315.
148. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev* 2013; 93(3):1139–206. doi: 10.1152/physrev.00020.2012.
149. Vagnerová K, Loukotová J, Ergang P, Musílková J, Mikšík I, Pácha J. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ stimulates 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in rat vascular smooth muscle cells. *Steroids* 2011; 76(6):577–81.
150. Jernigan NL, LaMarca B, Speed J, Galmiche L, Granger JP, Drummond HA. Dietary salt enhances benzamil-sensitive component of myogenic constriction in mesenteric arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(1):H409-20.
151. Yuen T, Wurmbach E, Pfeffer RL, Ebersole BJ, Sealfon SC. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(10):e48. doi: 10.1093/nar/30.10.e48.
152. Sayegh R, Auerbach SD, Li X, Loftus RW, Husted RF, Stokes JB et al. Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene. *J Biol Chem* 1999; 274(18):12431–7. doi: 10.1074/jbc.274.18.12431.
153. Muller OG, Parnova RG, Centeno G, Rossier BC, Firsov D, Horisberger J-D. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2003; 14(5):1107–15. doi: 10.1097/01.asn.0000061777.67332.77.
154. Wei Y, Lin D-H, Kemp R, Yaddanapudi GSS, Nasjletti A, Falck JR et al. Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways. *J Gen Physiol* 2004; 124(6):719–27. doi: 10.1085/jgp.200409140.
155. Pavlov TS, Ilatovskaya DV, Levchenko V, Mattson DL, Roman RJ, Staruschenko A. Effects of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid on the epithelial sodium channel (ENaC). *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(3):F672-81. doi: 10.1152/ajprenal.00597.2010.

156. Ozbaki-Yagan N, Liu X, Bodnar AJ, Ho J, Butterworth MB. Aldosterone-induced microRNAs act as feedback regulators of mineralocorticoid receptor signaling in kidney epithelia. *The FASEB Journal* 2020; 34(9):11714–28. doi: 10.1096/fj.201902254RR.
157. Hartmann J, Bajaj T, Klengel C, Chatzinakos C, Ebert T, Dedic N et al. Mineralocorticoid receptors dampen glucocorticoid receptor sensitivity to stress via regulation of FKBP5. *Cell Rep* 2021; 35(9):109185. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109185.
158. Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Cross-talk between aldosterone and angiotensin signaling in vascular smooth muscle cells. *Steroids* 2011; 76(9):834–9.
159. Estadella I, Pedrós-Gámez O, Colomer-Molera M, Bosch M, Sorkin A, Felipe A. Endocytosis: A Turn-over Mechanism Controlling Ion Channel Function. *Cells* 2020; 9(8).
160. Ma Y, Zhang P, Li J, Lu J, Ge J, Zhao Z et al. Epoxyeicosatrienoic acids act through TRPV4-TRPC1-KCa1.1 complex to induce smooth muscle membrane hyperpolarization and relaxation in human internal mammary arteries. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(3):552–9. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443914003822>.
161. Khan M, Meuth AI, Brown SM, Chandrasekar B, Bowles DK, Bender SB. Aldosterone impairs coronary adenosine-mediated vasodilation via reduced functional expression of Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2019; 317(2):H357-H363.
162. Sun X, Qian L-L, Li Y, Pfiefer TM, Wang X-L, Lee H-C et al. Regulation of KCNMA1 transcription by Nrf2 in coronary arterial smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2020; 140:68–76.
163. Kratschmar DV, Calabrese D, Walsh J, Lister A, Birk J, Appenzeller-Herzog C et al. Suppression of the Nrf2-dependent antioxidant response by glucocorticoids and 11 β -HSD1-mediated glucocorticoid activation in hepatic cells. *PLoS ONE* 2012; 7(5):e36774. doi: 10.1371/journal.pone.0036774.
164. Wu C, Zhang H, Zhang J, Zhang H, Zeng Y, Fang S et al. Increased oxidative stress, inflammation and fibrosis in perirenal adipose tissue of patients with cortisol-producing adenoma. *Adipocyte* 2019; 8(1):347–56. doi: 10.1080/21623945.2019.1690834.
165. Larsen BT, Miura H, Hatoum OA, Campbell WB, Hammock BD, Zeldin DC et al. Epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids dilate human coronary arterioles via BK(Ca) channels: implications for soluble epoxide hydrolase inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(2):H491-9. doi: 10.1152/ajpheart.00927.2005.
166. Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol Rev* 2012; 92(1):101–30. doi: 10.1152/physrev.00021.2011.
167. Yu Z, Davis BB, Morisseau C, Hammock BD, Olson JL, Kroetz DL et al. Vascular localization of soluble epoxide hydrolase in the human kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(4):F720-6.
168. Edin ML, Hamedani BG, Gruzdev A, Graves JP, Lih FB, Arbes SJ et al. Epoxide hydrolase 1 (EPHX1) hydrolyzes epoxyeicosanoids and impairs cardiac recovery after ischemia. *J Biol Chem* 2018; 293(9):3281–92. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29298899/>.
169. Marowsky A, Burgener J, Falck JR, Fritschy J-M, Arand M. Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. *Neuroscience* 2009; 163(2):646–61.
170. Luther JM, Wei DS, Ghoshal K, Peng D, Adler GK, Turcu AF et al. Treatment of Primary Aldosteronism Increases Plasma Epoxyeicosatrienoic Acids. *Hypertension* 2021; 77(4):1323–31. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14808.

171. Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M. A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Mol Biotechnol* 2013; 55(3):217–26. doi: 10.1007/s12033-013-9672-6.
172. Fang X, Weintraub NL, Stoll LL, Spector AA. Epoxyeicosatrienoic acids increase intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1999; 34(6):1242–6. doi: 10.1161/01.hyp.34.6.1242.
173. Morin C, Sirois M, Echave V, Gomes MM, Rousseau E. Epoxyeicosatrienoic acid relaxing effects involve Ca²⁺-activated K⁺ channel activation and CPI-17 dephosphorylation in human bronchi. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(5):633–41. doi: 10.1165/rcmb.2006-0281OC.
174. Good ME, Chiu Y-H, Poon IKH, Medina CB, Butcher JT, Mendu SK et al. Pannexin 1 Channels as an Unexpected New Target of the Anti-Hypertensive Drug Spironolactone. *Circ Res* 2018; 122(4):606–15.
175. Billaud M, Lohman AW, Straub AC, Looft-Wilson R, Johnstone SR, Araj CA et al. Pannexin1 regulates α 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction. *Circ Res* 2011; 109(1):80–5. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237594.
176. Nilsson H, Aalkjaer C. Vasomotion: mechanisms and physiological importance. *Mol Interv* 2003; 3(2):79-89, 51. doi: 10.1124/mi.3.2.79.
177. Holloway ET, Bohr DF. Reactivity of vascular smooth muscle in hypertensive rats. *Circ Res* 1973; 33(6):678–85. doi: 10.1161/01.res.33.6.678.

7. Anhang

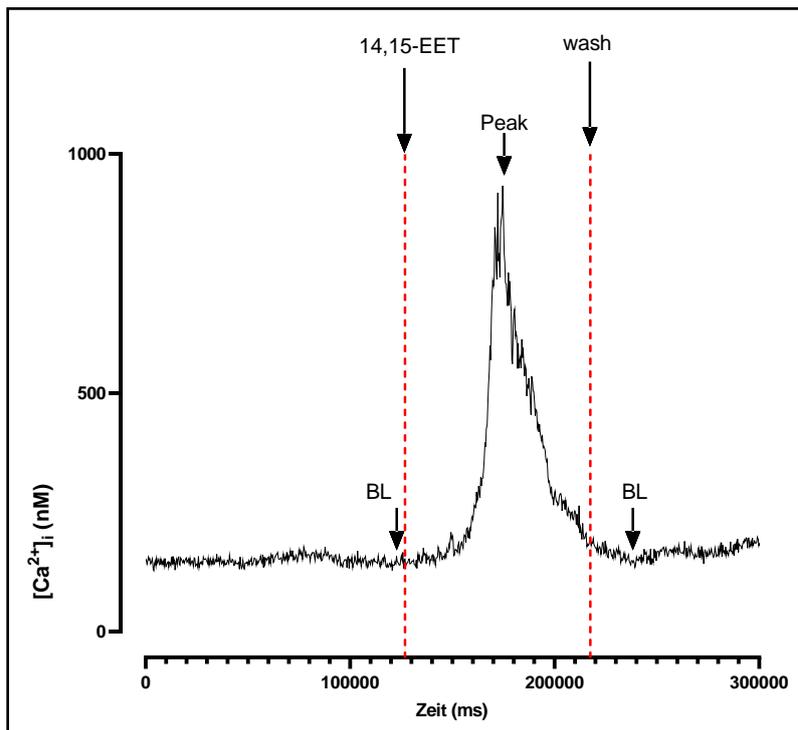


Abbildung 42: Graphische Darstellung des Versuchs zur Kalzium-Bildgebung bei der Kontrollbehandlung (DMSO + HC) zur Veranschaulichung der Bestimmung von BL und Peak. Die Pfeile markieren die in die Auswertung eingegangenen Messwerte. Die Baseline wurde einmal unmittelbar vor der EET-Zugabe bestimmt und nach dem Auswaschen. BL = Baseline, wash = Auswaschen mit HEPES-Puffer.

8. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Reincke für die Möglichkeit diese Dissertation unter seiner Leitung durchzuführen zu können.

Für die Betreuung durch Herrn Dr. Holger Schneider, dem Freiraum zum Einbringen eigener Ideen und dem anregenden Austausch bedanke ich mich sehr.

Allen medizinischen und labortechnischem Mitarbeitern des endokrinologischen Forschungslabors in der Ziemssenstraße 1, München, möchte ich herzlich für die freundliche Atmosphäre und Hilfsbereitschaft im Labor danken. Dies gilt insbesondere für Frau Michaela Höhne, welche viele Experimente durch ihr Wissen und ihre Assistenz erleichtert hat. Für die Einführung in die Besonderheiten der primären Zellkultur danke ich besonders Frau Petra Rank und Frau Diana Jaquin.

Mein Dank gilt auch der freundlichen Erlaubnis von Herrn Prof. Dr. Michael Mederos y Schnitzler das hochwertige Mikroskop und die Räumlichkeiten des Walther Straub-Institutes nutzen zu dürfen. Für die Einführung an das Mikroskop und Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Ursula Storch und bei Frau Laura Danner. Nur durch die Organisation und Beratung von Frau Laura Danner konnten die Experimente mit der empfindlichen Zellkultur in räumlich getrennten Gebäuden stattfinden.

Der interkulturelle und fachliche Austausch mit Jing Sun und Yao Meng hat mir viel Spaß gemacht, ich bedanke mich für diese Möglichkeit und wünsche beiden alles Gute für ihre weitere medizinische Laufbahn.

Die Korrektur der Arbeit wurde von Herrn Dr. Holger Schneider unterstützt, für diese Bemühungen möchte ich meinen Dank ausdrücken.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, Geschwistern und meinem Ehemann für ihre Unterstützung und Ermutigung danken.

9. Affidavit

Brunnenkant, Lisa Miriam Laura

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Der Epoxyeicosatriensäure-Signalweg der glatten Gefäßmuskulatur unter Aldosteronexzess
–transkriptionelle und funktionelle Effekte

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Heidelberg, 16.07.2023

Ort, Datum

L. Brunnenkant

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

10. Publikationsliste

Laura Brunnenkant, Yao Meng, Jing Sun, Jair Gonzalez Marques, Berthold Koletzko, Michael Mederos Y Schnitzler, Thomas Gudermann, Tracy Ann Williams, Felix Beuschlein, Daniel A Heinrich, Christian Adolf, Martin Reincke, Holger Schneider; The epoxyeicosatrienoic pathway is intact in endothelial and smooth muscle cells exposed to aldosterone excess; bioRxiv; 24.02.2021; doi: 10.1101/2021.02.04.429624