

Auswirkungen von Aldosteron auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe Universität
in Frankfurt am Main

von
Theresa Dartsch
aus Eisenach

Frankfurt, 2010

(D30)

Vom Fachbereich 14 Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec
PD Dr. med. C. Zobel

Datum der Disputation: 24.11.2010

Meiner lieben Familie

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. Zielsetzung | 1 |
| 2. Einleitung | 2 |
| 2.1 Herzinsuffizienz und elektrisches Remodeling | 2 |
| 2.1.1 Das atriale natriuretische Peptid (ANP)..... | 5 |
| 2.2 Ionenkanäle am Herzen | 5 |
| 2.2.1 Kaliumkanäle | 5 |
| 2.2.1.1 I_{K1} | 7 |
| 2.2.1.2 I_{to} und I_{Kur} | 9 |
| 2.2.2 Der spannungsabhängige Calciumkanal | 11 |
| 2.3 Aldosteron im Herzen | 14 |
| 2.4 Pharmakologie der Aldosteronantagonisten | 19 |
| 2.4.1 Spironolacton | 19 |
| 2.4.2 Eplerenon | 21 |
| 2.4.3 Klinische Wirksamkeit der Aldosteronantagonisten | 24 |
| 2.5 Signaltransduktion | 25 |
| 2.5.1 Calcineurin | 25 |
| 2.5.2 Proteinkinase C | 26 |
| 3. Material und Methoden | 29 |
| 3.1 Materialien | 29 |
| 3.1.1 Substanzen und allgemeine Lösungen | 29 |
| 3.1.2 Reagenzien | 29 |
| 3.1.2.1 RNA Extraktion und Umschreiben in cDNA | 29 |
| 3.1.2.2 Realtime-PCR Reagenzien | 30 |
| 3.1.2.3 Western Blot Reagenzien und Lösungsansätze | 30 |
| 3.1.2.4 Lösungen für die Elektronenmikroskopie..... | 34 |
| 3.1.2.5 Lösungen für Calcineurinaktivitätsbestimmung..... | 34 |
| 3.1.3 Geräte und Software | 35 |
| 3.1.3.1 Blutdruckaufzeichnung..... | 35 |
| 3.1.3.2 EKG-Aufzeichnung | 35 |
| 3.1.3.3 Elektrolyt- und Creatininbestimmung aus dem Plasma..... | 35 |
| 3.1.3.4 MKG-Aufzeichnung | 35 |
| 3.1.3.5 RNA Extraktion | 35 |
| 3.1.3.6 Realtime PCR | 36 |
| 3.1.3.7 Western Blot | 36 |
| 3.1.3.8 Elektronenmikroskopie | 36 |
| 3.2 Methoden | 37 |
| 3.2.1 Tiere | 37 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.2 Aldosterondosisfindung..... | 37 |
| 3.2.3 Pumpen | 37 |
| 3.2.4 Tierfutter | 39 |
| 3.2.5 Operationsmethode und Einteilung der Tiergruppen..... | 39 |
| 3.2.6 Blutdruckbestimmung..... | 40 |
| 3.2.7 Elektrolyt-und Creatininbestimmung | 41 |
| 3.2.8 Elektrokardiogramm (EKG) | 42 |
| 3.2.9 Magnetokardiogramm (MKG)..... | 43 |
| 3.2.10 RNA-Extraktion und Umschreiben in cDNA..... | 46 |
| 3.2.11 Realtime-PCR | 48 |
| 3.2.12 Western-Blot..... | 50 |
| 3.2.13 Elektronenmikroskopie..... | 54 |
| 3.2.14 Aktivitätsbestimmung von Calcineurin | 55 |
| 4. Ergebnisse..... | 58 |
| 4.1 Kardiale Hypertrophie | 58 |
| 4.2 ANP | 59 |
| 4.3 Systolischer Blutdruck..... | 59 |
| 4.4 Elektrolyte und Creatinin..... | 60 |
| 4.5 Elektronenmikroskopische Veränderungen am Herzen | 61 |
| 4.6 Elektrophysiologische Veränderungen am Herzen..... | 65 |
| 4.7 Ionenkanalexpression..... | 76 |
| 4.8 PKC- und Calcineurin-Signaltransduktion | 84 |
| 5. Diskussion | 89 |
| 6. Zusammenfassung | 97 |
| 7. Literatur | 100 |
| Anhang..... | 123 |
| Danksagung | 123 |
| Publikationen | 124 |
| Lebenslauf..... | 125 |
| Erklärung | 126 |
| Eidesstattliche Versicherung..... | 126 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------|--|
| ALD | Aldosteron behandelte Tiergruppe |
| ANP | atriales natriuretisches Peptid |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| β2m | β2-Microglobulin |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| cAMP | cyclisches AMP |
| CON | Kontrollgruppe |
| CYP3A4 | Cytochrom P450-3A4 |
| CYP11B2 | Cytochrom P450-11B2 |
| DAG | Diacylglycerol |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFR | <i>epidermal growth factor receptor</i> |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| ENaC | epithelialer Natriumkanal (<i>epithelial sodium channel</i>) |
| EPHESUS | <i>eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study</i> |
| EPL | Eplerenon behandelte Tiergruppe |
| FDA | <i>food and drug administration</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| IR | Intrazellulärer Rezeptor |
| MKG | Magnetokardiogramm |
| MR | Mineralkortikoidrezeptor |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| NFAT | <i>nuclear factor of activated T-cells</i> |
| NP-40 | Nonidet P-40 |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PEG-400 | Polyethylenglykol 400 |
| PIPES | Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) |
| PKA | Proteinkinase A |

| | |
|--------|---|
| PKC | Proteinkinase C |
| PMSF | Phenylmethylylsulfonylfluorid |
| PP1 | Proteinphosphatase 1 |
| PP2A | Proteinphosphatase 2A |
| PP2B | Proteinphosphatase 2B |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| RALES | <i>randomized aldactone evaluation study</i> |
| ROMK1 | <i>renal outer medullar K⁺-1 channel</i> |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) |
| RT-PCR | <i>Realtime-Polymerasekettenreaktion</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SGK1 | <i>serum- and glucocorticoid-induced proteinkinase 1</i> |
| SPI | Spirolacton behandelte Tiergruppe |
| SQUID | <i>superconducting quantum interference device</i> |
| StAR | <i>steroidogenic acute regulatory protein</i> |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |

1. Zielsetzung

Das „elektrische Remodeling“ ist ein wesentlicher Teilaspekt der Umbauvorgänge bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und beschreibt die Veränderungen der elektrischen Eigenschaften des Herzens. Eine kardiale Hypertrophie begünstigt das Auftreten von Arrhythmien und ist wesentliche Ursache für die spätere Ausbildung einer manifesten Herzinsuffizienz. Diese Erkrankungen stellen die führende Ursache für Morbidität und Letalität in der Bevölkerung dar. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt bei der Ausbildung des elektrischen Remodeling eine bedeutende Rolle und insbesondere erhöhte Aldosteronkonzentrationen korrelieren mit dem Risiko kardiovaskulärer Zwischenfälle. Der Einfluß von Aldosteron auf das kardiale System wird weiterhin anhand zweier klinischer Studien belegt. In der RALES- und in der EPHEsus- Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung herzinsuffizienter Patienten mit den Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon die Mortalität und Morbidität signifikant reduziert und insbesondere auch das Auftreten des plötzlichen Herztodes vermindert.

In dieser Arbeit soll daher der Einfluss einer chronischen Aldosteronstimulation auf die elektrischen Eigenschaften des Herzens im Rattenmodell untersucht werden. Insbesondere sollen die Auswirkungen auf die K^+ -Kanäle (I_{to} , I_{Kur} und I_{K1}) und den L-Typ Ca^{2+} -Kanal aufgeklärt sowie die zugrunde liegenden Signaltransduktionswege (PKC, Calcineurin) untersucht werden. Der Phänotyp unter Aldosteronexposition soll im Elektrokardiogramm und Magnetokardiogramm sowie mittels Elektronenmikroskopie näher beschrieben werden. Die Unterschiede der unspezifischen (Spironolacton) und der spezifischen (Eplerenon) Mineralkortikoidrezeptorblockade sollen ebenfalls in dieser Arbeit untersucht werden. Eine Kenntnis des Einflusses von Aldosteron auf die elektrischen Eigenschaften der Herzmuskelzelle und des gesamten Herzens würde es erlauben, neue Therapiekonzepte zur Behandlung der kardialen Hypertrophie/Herzinsuffizienz und der damit verbundenen Risiken zu entwickeln.

2. Einleitung

2.1 Herzinsuffizienz und elektrisches Remodeling

Die Herzmuskelhypertrophie ist eine Anpassungsreaktion, die sich als Antwort auf eine Druck- oder Volumenbelastung ausbildet. Sie ist bei vielen Formen der Herzerkrankung beteiligt, wie der koronaren Herzerkrankung, der arteriellen Hypertonie und bei Herzklappenerkrankungen. Initial ist eine ausreichende Herzleistung gewährleistet. Allerdings begünstigt die kardiale Hypertrophie das Auftreten von Arrhythmien und ist wesentliche Ursache für das spätere Auftreten einer manifesten Herzinsuffizienz. Diese Erkrankungen stellen die führende Ursache für Morbidität und Letalität in der Bevölkerung dar (Kannel 1991). So weisen Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie ein fünffach erhöhtes Risiko auf, an plötzlichem Herztod zu versterben (Kannel 1983). Das sogenannte elektrische Remodeling ist ein wesentlicher Teilaspekt der Umbauvorgänge bei der kardialen Hypertrophie und beschreibt die Veränderungen der elektrischen Eigenschaften des Herzens nach chronischer Druckbelastung.

Die charakteristische Form des kardialen Aktionspotentials wird durch das Verhältnis von depolarisierenden und repolarisierenden Strömen bestimmt (Abbildung 1). Während der Aufstrichphase des Aktionspotentials strömen Na^+ -Ionen in die Zelle, das Plateau wird durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen erreicht. In der Repolarisationsphase fließen K^+ -Ströme, wie der transiente Auswärtsstrom I_{to} , die Auswärtsgleichrichter I_{Kr} und I_{Ks} und der Einwärtsgleichrichter I_{K1} .

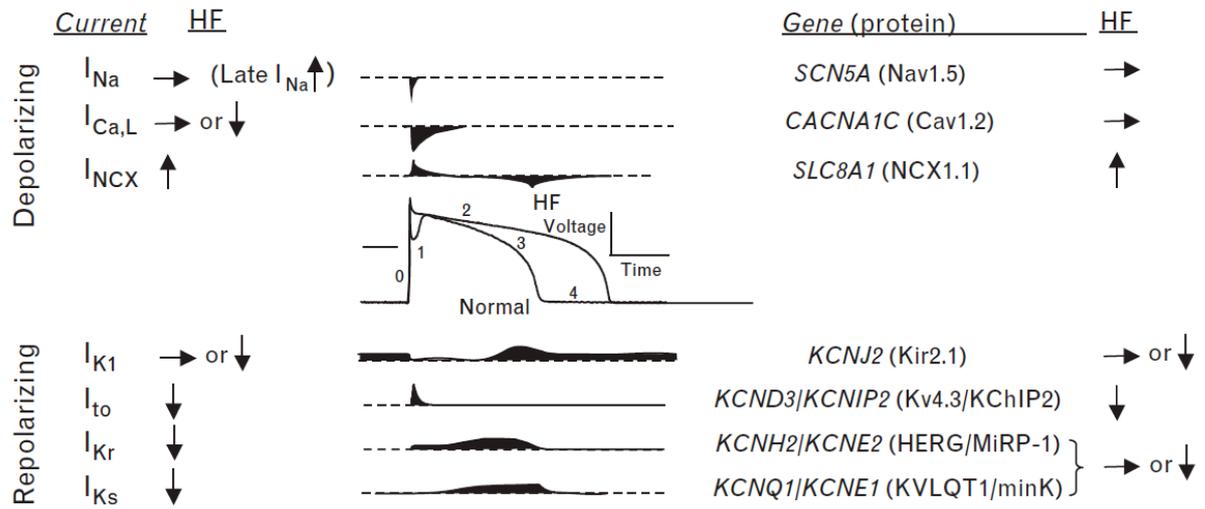


Abbildung 1: Ventrikuläres Aktionspotential und elektrisches Remodeling bei Herzinsuffizienz (Aiba and Tomaselli 2010)

Dargestellt sind die am kardialen Aktionspotential beteiligten Ströme sowie die Veränderungen der Stromdichte bei Herzinsuffizienz (HF= Heart Failure) (links) und die zugrunde liegenden Gene/Proteine und deren Expressionsmuster (rechts). I_{Na} Natriumstrom; $I_{Ca,L}$ L-Typ Calciumstrom, I_{NCX} Strom des Na^+/Ca^{2+} Austauschers, I_{K1} einwärtsgerichteter K^+ -Strom, I_{to} transienter K^+ -Auswärtsstrom, I_{Kr} und I_{Ks} schnell und langsam aktivierbare K^+ -Ströme. I_{Kur} ist in obiger Abbildung nicht dargestellt, da dieser Strom im humanen Aktionspotential nur im Vorhof detektiert wird, mRNA und Protein sind jedoch im Ventrikel vorhanden. Phase 0: schnelle Depolarisation, Phase 1: schnelle frühe Repolarisation, Phase 2: langsame Repolarisation (Plateauphase), Phase 3: schnelle späte Repolarisation, Phase 4: Ruhemembranpotential

Nachgewiesen sind bei der Ausbildung einer Hypertrophie und Herzinsuffizienz eine Verlängerung und ein verändertes Profil des Aktionspotentials, Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase sowie Veränderungen der Expression und Funktion von K^+ -Strömen (Armoundas et al. 2001; Aiba and Tomaselli 2010) (siehe Abbildung 1). So kommt es zu einer Reduktion repolarisierender K^+ -Ströme (I_{to} , I_{Ks} , I_{Kr} , I_{K1}) sowie deren Proteinexpression und zu einer Zunahme depolarisierender Ströme (I_{Na} , I_{Ca} , I_{NCX}). Die elektrischen Veränderungen des Herzens führen zu einer verlängerten Aktionspotentialdauer und effektiven Refraktärzeit und begünstigen das Auftreten von frühen Nachdepolarisationen, die ihrerseits in Anwesenheit eines arrhythmiefördernden Substrates lang anhaltende Kammerarrhythmien auslösen können. Das elektrische Remodeling ist von wesentlicher Bedeutung, da circa 50% der herzinsuffizienten Patienten an plötzlichem Herztod versterben, das heißt sie erleiden einen rhythmogenen Herztod (Tomaselli et al. 1994; Abildstrom et al. 2002).

Auch wenn die Veränderungen der Stromdichte von Ionenkanälen im Rahmen des elektrischen Remodeling gut dokumentiert sind, herrscht noch weitgehende Unklarheit über die Signaltransduktionsmechanismen, die dies bewirken. Hier scheint das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine wesentliche Rolle zu spielen. Das Prinzip der Hemmung verschiedener Komponenten dieses Systems ist zentraler Baustein in der Therapie der arteriellen Hypertonie und der Herzinsuffizienz. Nachdem man sich zunächst auf die Wirkungen von Angiotensin II fokussiert hatte, wurde in den letzten Jahren zunehmend die Bedeutung von Aldosteron als unabhängiger Risikofaktor in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen erkannt. Eine additive Aldosteronblockade (zusätzlich zu der ACE-Hemmung) bei herzinsuffizienten Patienten konnte sowohl in der RALES-Studie (Pitt et al. 1999) als auch in der EPHEsus-Studie (Pitt et al. 2003b) eine signifikante Reduktion der kardiovaskulären Sterblichkeit, insbesondere des plötzlichen Herztodes, bewirken. Weiterhin wurde beschrieben, dass lokale Aldosteronwirkungen bei der Ausbildung des Phänotyps bei hypertropher Kardiomyopathie beteiligt sind (Tsybouleva et al. 2004). Bei Patienten mit essentieller arterieller Hypertonie zeigte sich eine erhöhte kardiale Produktion von Aldosteron (Yamamoto et al. 2002). Die Plasmakonzentrationen von Aldosteron können bei herzinsuffizienten Patienten bis zu 8322 pmol/L betragen (normal sind 139-416 pmol/L) (Weber 2001), möglicherweise werden lokal im Herzen auch noch höhere Konzentrationen erreicht (Silvestre et al. 1999; Mizuno et al. 2001).

Der Nutzen der Mineralkortikoidrezeptorantagonisten im Zusammenhang mit der RAAS-Blockade ist bis heute nicht vollständig verstanden. Die Effekte lassen sich nicht nur auf die Wirkungen auf den Blutdruck durch renale Mineralkortikoidrezeptorblockade zurückführen (Pitt et al. 1999; Pitt et al. 2003b). Es wird heute vielmehr angenommen, dass Aldosteron außerdem extrarenale Wirkungen ausübt, deren Blockade die kardiovaskuläre Sterblichkeit reduziert.

2.1.1 Das atriale natriuretische Peptid (ANP)

Das atriale natriuretische Peptid (ANP), ebenso als atrialer natriuretischer Faktor (ANF) bezeichnet, ist klassisch an der Langzeitregulation des Salz- und Wasserhaushaltes und somit an der Regulation des Blutvolumens und -druckes beteiligt. Die Synthese des ANP findet in den Kardiomyozyten des Atriums statt, bei einer Hypertrophie des Herzmuskels auch im Ventrikel (Levin et al. 1998) und dient daher als Hypertrophiemarker. Die Ausschüttung erfolgt durch verschiedene Stimuli wie Vorhofdehnung, Angiotensin II, Endothelin und β -Rezeptorstimulation. ANP stellt ein direktes Bindeglied zwischen kardiovaskulärem und renalem System dar. Patienten mit Herzinsuffizienz, Hypertonie sowie Herzklappenfehlern weisen signifikant erhöhte ANP-Konzentrationen im Serum auf (Wei et al. 1993; Ruskoaho 2003). ANP inhibiert die Renin- und Aldosteronfreisetzung in der Niere und Nebenniere (Levin et al. 1998). In Kardiomyozyten konnte nachgewiesen werden, dass ANP die mRNA Expression von CYP11B2 (Aldosteronsynthase) vermindert (Ito et al. 2003). Die Infusion von ANP bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt (Hayashi et al. 2001) oder während chirurgischer Eingriffe am Herzen (Hayashi et al. 2003) führt zu einer signifikanten Abnahme der Plasmakonzentrationen von Aldosteron, Angiotensin II und Endothelin-1.

2.2 Ionenkanäle am Herzen

2.2.1 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind transmembranäre Proteinkomplexe, die K^+ -Ionen selektiv entlang des elektrochemischen Gradienten über die Zellmembran leiten. Über 200 Gene, die für verschiedene K^+ -Kanäle kodieren, konnten bislang identifiziert werden. Allen gemeinsam ist ein Tripeptid-Sequenzmotiv aus GYG, GFG oder GIG, das in der Porenregion des Kanalproteins lokalisiert ist und die Selektivität für K^+ -Ionen ausmacht. Die Klassifikation der Kanäle erfolgt anhand der primären Aminosäuresequenz der porenbildenden α -Untereinheit. So werden drei Familien mit sechs, vier oder zwei Transmembrandomänen

unterschieden (Abbildung 2). Diese beinhalten 1. die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle (K_v), die sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und eine Porendomäne zwischen S5 und S6 ausbilden, 2. die einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanäle (K_{ir}), bestehend aus zwei Transmembrandomänen (M1 und M2) und einer Porenschleife und 3. die zweiporigen K^+ -Kanäle („Hintergrund K^+ -Kanäle“) mit vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen. Ein K^+ -Kanal setzt sich klassisch aus vier α -Untereinheiten zusammen, die eine zentrale Pore ausbilden (Abbildung 2 oben). Kaliumkanäle spielen eine fundamentale Rolle in der Repolarisationsphase des Aktionspotentials im Herzen und sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

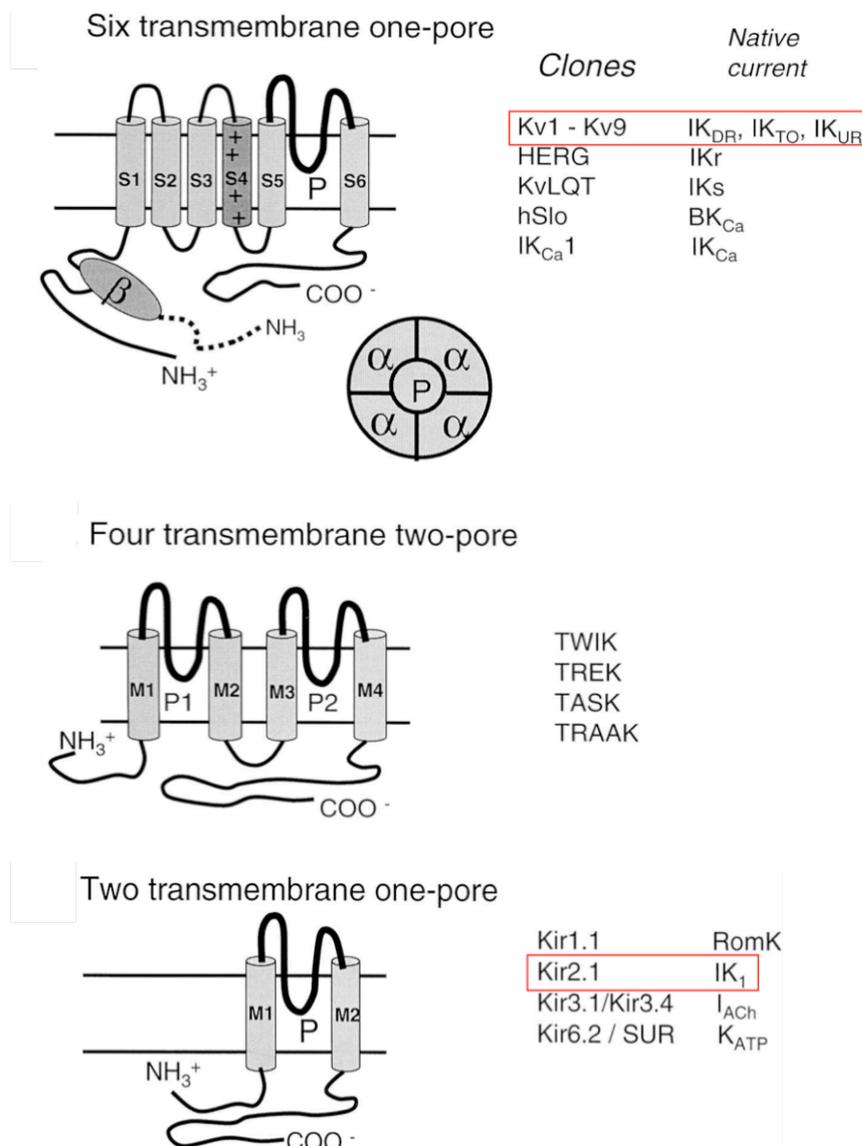


Abbildung 2: Schematische Darstellung der porenbildenden α -Untereinheiten der Kaliumkanäle (Shieh et al. 2000)

Die Kaliumkanäle werden aufgrund ihrer Membrantopologie in drei Gruppen eingeteilt, die wiederum aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in Familien und weiter in Unterfamilien gegliedert werden. In der oberen Abbildung sind die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle (K_v) dargestellt, die sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und eine Porendomäne zwischen S5 und S6 ausbilden und zu denen der I_{to} und der I_{Kur} gehören. Die mittlere Abbildung zeigt die zweiporigen K^+ -Kanäle („Hintergrund K^+ -Kanäle“) mit vier Transmembrandomänen und zwei Porendomänen, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll und in der unteren Abbildung sind die einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanäle (K_{ir}) dargestellt, die aus zwei Transmembrandomänen (M1 und M2) und einer Porenschleife bestehen und zu denen der I_{K1} gehört.

2.2.1.1 I_{K1}

Obwohl die Einwärtsgleichrichter eine große Familie der K^+ -Kanäle bilden (Abbildung 3) und untereinander große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, unterliegen nur zwei Unterfamilien K_{ir2} und K_{ir3} der klassischen „Einwärtsrektifizierung“ und wurden ursprünglich im Skelettmuskel und im Herzmuskel detektiert. Im Herzen sind nur zwei Typen dieser Ströme vorhanden, zum einen der I_{K1} , der vermehrt im Ventrikel des Herzens von Bedeutung ist und in dieser Arbeit näher betrachtet werden soll, und zum anderen der $I_{K_{Ach}}$, der im Atrium des Herzens und im Sinusknoten eine Rolle spielt. Die Familie der einwärtsrektifizierenden K_{ir} Kanäle umfasst sieben Unterfamilien (K_{ir1} - K_{ir7}) (Abbildung 3) (Kubo et al. 2005).

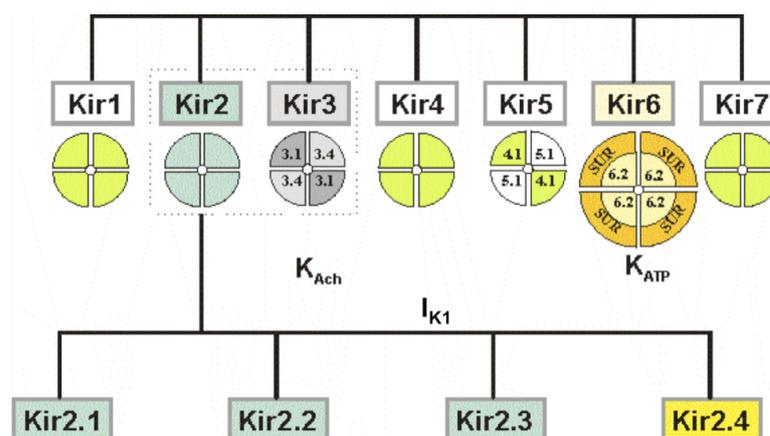


Abbildung 3: Unterfamilien des einwärtsrektifizierenden K^+ -Kanals (Anumonwo and Lopatin 2010)

Nur K_{ir2} und K_{ir3} unterliegen der klassischen Einwärtsrektifizierung. Heteromere aus $K_{ir2.1}$, $K_{ir2.2}$ und $K_{ir2.3}$ Untereinheiten werden im Herzen exprimiert und bilden den I_{K1} . $K_{ir2.4}$ konnte nur in neuronalem Gewebe im Herzen detektiert werden und spielt daher nur eine untergeordnete Rolle.

Bis heute konnten vier Untereinheiten der Kir2 Unterfamilie (Kir2.1-Kir2.4) in Säugetieren kloniert werden. Die Kir2 Untereinheiten werden im Herzen exprimiert, wobei die Expressionslevel der einzelnen Untereinheiten abhängig von der Region des Herzens sowie Spezies-abhängig variieren. So konnte die Kir2.4 Untereinheit nur in neuronalem Gewebe im Herzen von Meerschweinchen lokalisiert werden (Liu et al. 2001), so dass die potentiellen Untereinheiten, die dem I_{K1} zugrunde liegen, in Säugetieren auf Kir2.1-Kir2.3 begrenzt werden. Wie die Kir-Untereinheiten, die den K^+ -Kanal ausbilden, im Einzelnen zusammengesetzt sind, ist abhängig von der Tierspezies, dem Zelltyp aber auch von der Membranlokalisation und ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. In Western-Blot Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten Kir2.1 und Kir2.2 in ventrikulären Kardiomyozyten des Kaninchens exprimiert werden und dass der I_{K1} überwiegend aus Kir2.1 und Kir2.2 Heterotetrameren gebildet wird (Zobel et al. 2003). In Kardiomyozyten des Meerschweinchens hingegen konnten alle drei Transkripte detektiert werden mit Kir2.1>Kir2.2~Kir2.3 (Liu et al. 2001). In humanen Kardiomyozyten des rechten Ventrikels scheinen ebenfalls alle Kanaluntereinheiten für die Funktion des I_{K1} von Bedeutung zu sein (Schram et al. 2003).

Der I_{K1} ist ein spannungsabhängiger (d.h. Öffnung durch Änderungen des Membranpotentials) einwärtsrektifizierender K^+ -Strom, der im Aktionspotential für die späte Repolarisationsphase und die Stabilisierung des Ruhepotentials im Vorhof und Ventrikel des Herzens von großer Bedeutung ist. Die Aktivierung des Kanals erfolgt durch die Membranhyperpolarisation der Zelle und es folgt die Diffusion von Polyaminen und Mg^{2+} -Ionen von der Kir-Kanalpore, so dass K^+ -Ionen den Kanal passieren können. Die K^+ -Kanäle stabilisieren das Ruhemembranpotential von Neuronen, sowie von Herz- und Skelettmuskelzellen. Damit bestimmen sie maßgeblich die Schwelle für das Auslösen eines Aktionspotentials.

Eine verminderte Aktivität des I_{K1} in Kir2.1 Knock-out Mäusen führte zu einer vermehrten spontanen Aktivität der Kardiomyozyten und zu verlängerten Aktionspotentialen, wobei

jedoch keine Arrhythmien detektiert wurden (Zaritsky et al. 2001; Zaritsky et al. 2000). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Aktivitätsminderung des I_{K1} um mehr als 90% in transgenen Mäusen, die dominant negative Kir2.1-AAA Untereinheiten exprimieren, zu einer Verlängerung des QRS-Komplexes und des QT-Intervalls sowie einem verlängerten Aktionspotential im Herzen dieser Tiere führt (McLerie and Lopatin 2003). Nach adenoviraler Expression der Kir2.1-AAA Untereinheiten kam es bei 40% der Meerschweinchen in EKG-Aufzeichnungen zusätzlich zu der Ausbildung ventrikulärer Extrasystolen (Miake et al. 2003). In ventrikulären Kardiomyozyten wurde eine Abnahme der I_{K1} Stromdichte bei Patienten mit Herzinsuffizienz und in herzinsuffizienten Ratten detektiert (Beuckelmann et al. 1993; Pogwizd et al. 2001; Fauconnier et al. 2005). Jedoch wurde ebenso berichtet, dass der I_{K1} Strom in herzinsuffizienten Kaninchen und in Kardiomyozyten unverändert ist (Tsuji et al. 2000; Rozanski et al. 1997).

Welchen Einfluß erhöhte chronische Aldosteronkonzentrationen auf die Expression des I_{K1} im Herzen haben ist nicht bekannt und soll in vorliegender Arbeit untersucht werden.

2.2.1.2 I_{to} und I_{Kur}

Die Kv-Kanäle sind im Menschen durch 40 verschiedene Gene kodiert und werden in 12 Unterfamilien eingeteilt. Alle Kv-Kanäle in Säugetieren setzen sich aus vier α -Untereinheiten zusammen, wobei jede sechs transmembranäre α -Helices aufweist (S1-S6) sowie eine membrandurchspannende P-Schleife. Die vier Untereinheiten sind kreisförmig um die zentrale Pore als Homotetramere oder auch als Heterotetramere angeordnet. Die ionenleitende Pore wird durch vier S5-P-S6 Sequenzen ausgekleidet. Die vier S1-S4 Segmente, die jeweils vier positiv-geladene Argininreste aufweisen, fungieren als Spannungssensoren (Long et al. 2005). Durch Öffnung des Kv-Kanals kommt es zum Efflux positiver Ladung, was eine Repolarisation oder sogar Hyperpolarisation der Zellmembran bewirkt. In erregbaren Zellen

wie Neuronen oder kardialen Kardiomyozyten werden daher Kv-Kanäle häufig zusammen mit spannungsabhängigen Na^+ - und/oder Ca^{2+} - Kanälen (Ca_v) exprimiert und steuern dort die Repolarisation im Aktionspotential.

Kv4.2 und Kv4.3 Untereinheiten werden primär im ZNS und im Herzen exprimiert und leiten dort den I_{to} . Der I_{to} ist ein spannungsabhängiger auswärtsgerichteter Ca^{2+} -unabhängiger Kaliumstrom, der sich durch schnelle Aktivierung und Inaktivierung in Antwort auf die Depolarisation im Aktionspotential auszeichnet. Der I_{to} ist dabei für die frühe und schnelle Repolarisation des Aktionspotentials verantwortlich (Nerbonne 2000; Oudit et al. 2001). Er beeinflusst die Aktivierung anderer Ströme, die ebenfalls die Repolarisation steuern, wie den $I_{\text{Ca,L}}$ und den I_{K} . Kv4.3 stellt die dominante Untereinheit dar, die den humanen I_{to} leitet (Kaab et al. 1998a; Wang et al. 1999b). Kv4.3 mRNA Transkripte sind bei herzinsuffizienten Patienten erniedrigt exprimiert und diese Downregulation ist mit einer Abnahme der Stromdichte des I_{to} gekoppelt (Kaab et al. 1998b). Herzinsuffizienz, kardiale Hypertrophie und Ischämie werden mit einem verlängerten Aktionspotential assoziiert, das partiell durch eine Downregulation des I_{to} verursacht wird (Pinto and Boyden 1999; Tomaselli and Marban 1999; Oudit et al. 2001).

Der I_{to} wurde in Verbindung mit Aldosteron untersucht. Dabei wurde eine Abnahme der Stromdichte in vitro unter chronischer Aldosteronexposition in isolierten Kardiomyozyten der Ratte und Maus detektiert (Ouvrard-Pascaud et al. 2005; Benitah et al. 2001). In vivo gibt es keine Angaben zu direkten Aldosteron-assoziierten Änderungen des I_{to} bei chronischer Exposition. So liegt lediglich eine Studie vor, in der es nach Überexpression des Mineralkortikoidrezeptors (MR) in Mäusen zu der Ausbildung ventrikulärer Arrhythmien und einer Abnahme des I_{to} -Stromes kommt (Ouvrard-Pascaud et al. 2005).

Der Kv1.5-Kanal gehört zu einer weiteren Unterfamilie der Kv-Kanäle, der verzögert rektifizierenden K^+ -Kanäle, und leitet im humanen Herzen den ultraschnellen I_{Kur} -Strom. Kv1.5 bildet die α -Untereinheit des I_{Kur} und wird durch KCNA5 kodiert. Im Menschen wurde

der I_{Kur} im Atrium detektiert, nicht aber in ventrikulären Kardiomyozyten, obwohl das Kv1.5 Kanalprotein in beiden Ventrikeln vorhanden ist.

Patienten mit chronischem Vorhofflimmern zeigen einen verminderten I_{Kur} Strom und eine erniedrigte Kv1.5 Expression (Nattel 2002). Kv1.5 Transkripte sind in hypertensiven Ratten, die eine ventrikuläre Hypertrophie entwickelten, erniedrigt exprimiert (Matsubara et al. 1993) wie auch im Epikard im Ventrikel von Hunden nach Herzinfarkt (Pinto and Boyden 1999). Die Auswirkungen von Aldosteron auf diesen repolarisierenden Strom sind nicht bekannt und sind ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

2.2.2 Der spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanal

Der L-Typ Calciumkanal gehört zu den spannungsabhängigen Kanälen, der nach Aktivierung während der Membrandepolarisation einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen entlang seines elektrochemischen Gradienten in die Zelle steuert. Dadurch kommt es zu einer Ca^{2+} -getriggerten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der Zelle, die über Ryanodinrezeptoren vermittelt wird. Der folgende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zu der Aktivierung von Myofilamenten und schließlich zu der Kontraktion der Zelle. Der Kanal ist ubiquitär vorhanden, im Skelett- und Herzmuskel sowie im zentralen und peripheren Nervensystem und in endokrinem Gewebe.

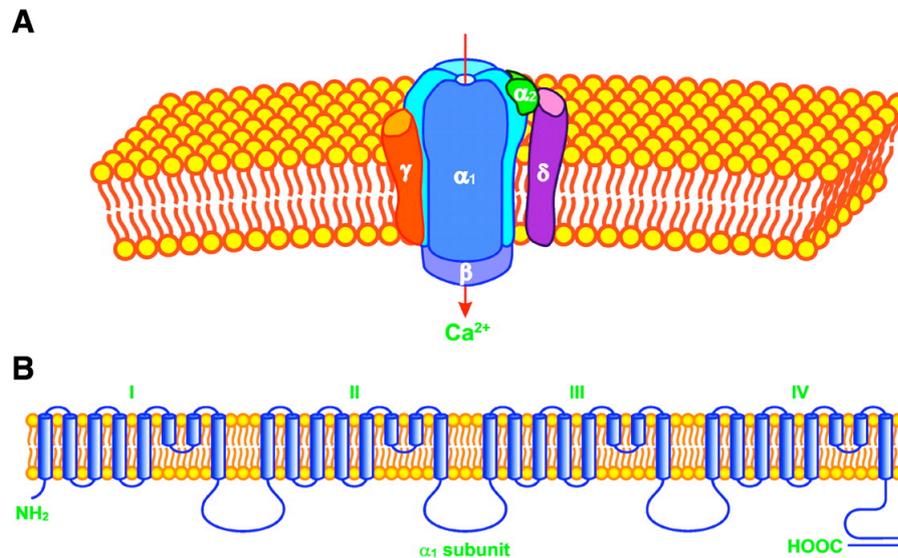


Abbildung 4: Struktur des L-Typ-Calciumkanals (Yang and Berggren 2005)

A Der in der Zellmembran lokalisierte Calciumkanal besteht aus den Kanaluntereinheiten α_1 , β , α_2/δ und γ . Die α_1 -Untereinheit bildet die Pore des Kanals aus, die β -Untereinheit ist intrazellulär lokalisiert, die α_2 -Untereinheit ist extrazellulär über eine Disulfidbrücke mit der δ -Untereinheit verbunden. Die γ -Untereinheit wurde in Verbindung mit dem Calciumkanal nur in einigen Geweben detektiert.

B Darstellung der α_1 -Untereinheit. Sie weist vier homologe Domänen (I-IV) auf, die jeweils aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) (blau) gebildet werden. Der Spannungssensor sitzt in S4 (positiv geladene Aminosäuren).

Die spannungsgesteuerten Calciumkanäle (Ca_v s) werden anhand ihrer α_1 - Untereinheit in drei Familien unterteilt: L-Typ (long-lasting) (Ca_v1), Non-L-Typ (Ca_v2) sowie T-Typ (transient) (Ca_v3). Im Herzen sind die Kanäle vom L-Typ und vom T-Typ exprimiert. Der kardiale L-Typ Ca^{2+} -Kanal gehört zu der Familie Ca_v1 . Er besteht aus vier Polypeptiduntereinheiten (α_1 , β , α_2/δ , γ) und bildet heterotetramere Komplexe (Abbildung 4) (Catterall 2000). Die α_1 -Untereinheit bildet die Pore, die den Ionenfluß ermöglicht. Sie besteht aus vier homologen Domänen (I-IV), die jeweils aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) gebildet werden (Tanabe et al. 1987). Die α_1 -Untereinheit ist für die spannungsabhängige Öffnung des Kanals verantwortlich, positiv geladene Aminosäuren in den S4 Segmenten bilden den Spannungssensor und durch ein bestimmtes Aminosäuremuster wird die Selektivität für Ca^{2+} -Ionen bestimmt. Die β -Untereinheit ist intrazellulär lokalisiert, die α_2 -Untereinheit liegt extrazellulär und ist über eine Disulfidbrücke mit der δ -Untereinheit verbunden. Die γ -Untereinheit besteht aus vier Transmembransegmenten und wurde in Verbindung mit dem Calciumkanal nur in einigen Geweben detektiert. Diese Hilfsuntereinheiten beeinflussen die

Öffnungseigenschaften und die Expression des Calciumkanals (Bers 2002; Bodi et al. 2005; Kamp and Hell 2000). Die L-Typ Calciumkanäle weisen vier verschiedene porenbildende α_1 -Untereinheiten auf: $\text{Ca}_v1.1$ (α_{1S}), $\text{Ca}_v1.2$ (α_{1C}), $\text{Ca}_v1.3$ (α_{1D}) und $\text{Ca}_v1.4$ (α_{1F}), wobei nur α_{1C} ($\text{Ca}_v1.2$) in hohen Konzentrationen im Ventrikel des Herzens exprimiert wird (Bodi et al. 2005; Hullin et al. 1999).

In einem gendefizienten Mausmodell konnte die Bedeutung von $\text{Ca}_v1.2$ gezeigt werden. Hier kam es bei den Mäusen durch Ausschaltung des $\text{Ca}_v1.2$ Gens (*CACNA1C*) zu embryonaler Letalität bereits vor Tag 14,5 post coitum (Seisenberger et al. 2000). In verschiedenen Modellen der kardialen Hypertrophie konnte eine gesteigerte L-Typ Calciumkanalaktivität nachgewiesen werden (Wang et al. 2001b; Yatani et al. 2001). Auch liegen Studien über einen Einfluß von Aldosteron auf die Funktion und Expression des $\text{Ca}_v1.2$ vor. In Ratten- und neonatalen Mausekardiomyozyten sowie in einem Tiermodell mit überexprimiertem MR führte eine chronische Aldosteronexposition zu einer erhöhten Stromdichte des $I_{\text{Ca,L}}$ (Benitah and Vassort 1999; Perrier et al. 2005; Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass erhöhte Aldosteronkonzentrationen in murinen Kardiomyozyten keine Veränderungen des $\text{Ca}_v1.2$ auf mRNA- und Proteinebene bewirken (Boixel et al. 2006).

Da die meisten Studien *in vitro* durchgeführt wurden und die Datenlage widersprüchlich ist, soll im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung von Aldosteron auf die Expression des kardialen $\text{Ca}_v1.2$ -Kanals untersucht werden.

2.3 Aldosteron im Herzen

Das Mineralkortikoid Aldosteron wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde aus Cholesterol synthetisiert.

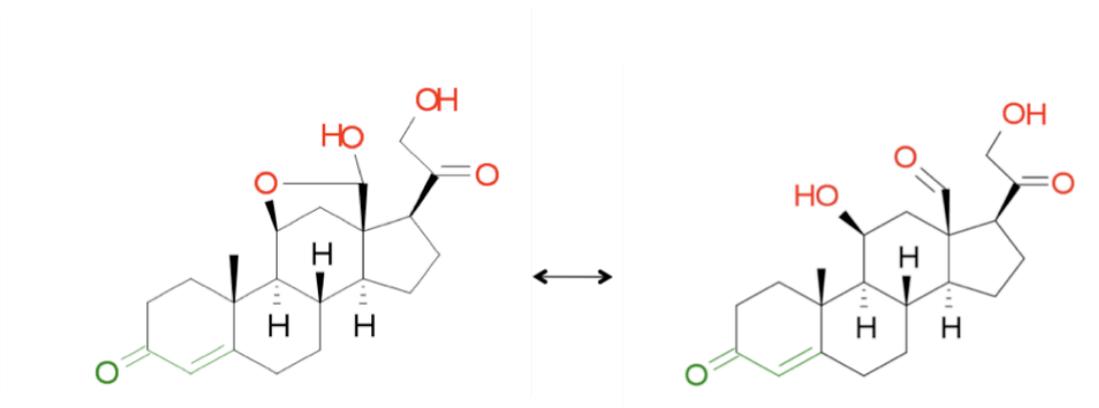


Abbildung 5: Aldosteron Struktur

Das native Mineralkortikoid Aldosteron wird biogenetisch aus Cholesterol gebildet. Zwischen der cyclischen Halbacetal-Form (links) und der Aldehyd-Form (rechts) bildet sich in Lösung ein Gleichgewicht aus, wobei die Halbacetal-Form dominiert.

Die klassische Rolle von Aldosteron ist die Stimulation des unidirektionalen, transepithelialen Natriumrücktransportes sowie eine Steigerung der K^+ - Ionen- und Mg^{2+} - Ionen-Freisetzung in der Niere. Auch in Kardiomyozyten sind alle Komponenten für spezifische und selektive Effekte von Aldosteron vorhanden. Der MR ist sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im kardiovaskulären System exprimiert (Lombes et al. 1995). Auch die für die Aldosteronsynthese benötigten Enzyme scheinen im menschlichen Herzen exprimiert zu werden, wie die Cytochrom P450 11 β -Hydroxylase 2 (CYP11B2, „Aldosteron-Synthase“) (Silvestre et al. 1998) und das „Steroidogenic acute regulatory Protein“ (StAR) (Casal et al. 2003), das den intramitochondrialen Cholesteroltransfer ermöglicht, der den limitierenden Faktor bei der Steroidogenese darstellt. Auch die 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ II (11 β -HSD II) ist im Herzen exprimiert (Lombes et al. 2000). Sie schützt die MR enzymatisch gegen Glukokortikoide, indem diese in rezeptorinaktive 11-Ketoanalogue umgewandelt werden. Die lokale Synthese von Aldosteron konnte sowohl in myokardialem Gewebe der

Ratte (Silvestre et al. 1998) als auch im menschlichen Herzen (Kayes-Wandover and White 2000) nachgewiesen werden.

Die pathophysiologische Rolle von Aldosteron bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen wurde lange Zeit auf dessen Volumen-/Expansions- und blutdrucksteigernden Effekt, der über den MR in Epithelzellen des renalen Tubulus vermittelt wird, zurückgeführt. In letzter Zeit weisen viele klinische und experimentelle Studien darauf hin, dass ein direkter MR-vermittelter Effekt von Aldosteron auf das kardiovaskuläre System in nicht-epithelalem Gewebe zu der Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen führt. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus ein höheres Risiko kardiovaskulärer und renaler Komplikationen aufweisen als Patienten mit essentieller Hypertonie (Milliez et al. 2005).

Die Auswirkungen von Aldosteron auf das Herz sind vielfältig und beinhalten eine Potenzierung der Katecholaminwirkung, eine Verminderung des koronaren Blutflusses (Farquharson and Struthers 2002; Romagni et al. 2003), eine Entzündungsreaktion der Koronararterien (Sun et al. 2002), ventrikuläre Arrhythmien (Arora and Somani 1962; Cittadini et al. 2003), myokardiale Fibrose (Brilla et al. 1993) und Myokardhypertrophie. Bedeutsam ist, dass Aldosteron auch blutdruckunabhängig mit dem Ausmaß der kardialen Hypertrophie korreliert (Duprez et al. 1993). Wichtiger Stimulator der Aldosteronsynthese ist Angiotensin II, so dass eine Hemmung von Angiotensin II auch die Aldosteronsynthese hemmt. Dies ist allerdings nur initial der Fall, und es kommt aus noch nicht geklärten Gründen nach längerer Renin-Angiotensin-Blockade zum Wiederanstieg der Aldosteronkonzentrationen auf Höhe der Ausgangswerte. Dieser Effekt ist als „*Aldosterone Escape*“ bekannt (Staessen et al. 1981; Struthers 1995; Struthers 1995).

Die Rolle von Aldosteron im Rahmen des kardialen elektrischen Remodeling ist weitgehend unklar. Es gibt jedoch Berichte über eine Einflussnahme von Aldosteron auf die Expression und Funktion einzelner Ionenkanäle. In kultivierten Rattenkardiomyozyten kommt es zu einer

signifikanten Erhöhung der Stromdichte des Calciumstromes I_{Ca} nach Inkubation mit Aldosteron über einen Zeitraum von 24 Stunden (Benitah and Vassort 1999). Unter gleichen Bedingungen bewirkt Aldosteron eine Verminderung der Stromdichte des Kaliumstromes I_{to} nach 48 Stunden Inkubationsdauer (Benitah et al. 2001). Auch wurde in vitro eine Veränderung des Aktionspotentials im Sinne einer Verlängerung der Repolarisationsdauer in Kardiomyozyten beobachtet (Benitah et al. 2001). Nach Überexpression des MR in Mäusen kommt es zu der Ausbildung schwerer Arrhythmien, was den Einfluß des Mineralkortikoids bei der Entstehung des elektrischen Remodeling belegt (Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Hier scheint die Überexpression des MR direkt das Auftreten von Arrhythmien zu begünstigen. Dies ermöglicht die Annahme eines zusätzlichen Mechanismus, wie durch MR-Blockade das Auftreten des plötzlichen Herztodes bei Patienten reduziert werden kann. Zusätzlich konnte Spironolacton elektrophysiologische Parameter wie eine QT-Dispersion verbessern (Yee et al. 2001).

Aldosteron vermittelt seine Wirkungen entweder über genomische (langsame) oder nicht-genomische (schnelle) Mechanismen. Welche Rolle die beiden Mechanismen für die ungünstigen Wirkungen des Mineralkortikoids im Einzelfall spielen, ist zum Teil noch ungeklärt. Genomische Effekte werden klassisch über die Bindung von Aldosteron an den intrazellulären MR vermittelt, der nach Dissoziation von einem Multiproteinkomplex in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor die Genexpression durch spezifische Bindung an entsprechenden Zielsequenzen verändert (Funder et al. 1988). In epitheliale Gewebe kommt es dadurch zur erhöhten Expression des epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC, „*Epithelial Sodium Channel*“), ROMK1 („*Renal outer medullar K^+ I-Channel*“), der Na^+/K^+ -ATPase, die den Elektrolyttransport in der Niere steuert sowie SGK1 („*Serum- and Glucocorticoid-induced Proteinkinase I*“), die den Transporter reguliert.

Die nicht-genomischen Wirkungen von Aldosteron sind dadurch definiert, dass sie innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Applikation in verschiedenen Geweben (z.B. Herz und

Gefäßsystem) nachgewiesen werden können. Die genauen Wirkmechanismen und Signaltransduktionskaskaden, die diese akuten Wirkungen vermitteln, konnten noch nicht aufgeklärt werden. Prinzipiell ist das Vorhandensein eines bisher unbekanntem membrangebundenen Aldosteronrezeptors denkbar wie er für andere Steroidhormone diskutiert wird (Wehling 1997). Weiterhin ist es möglich, dass der klassische MR neben seiner Rolle als Transkriptionsfaktor auch intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen aktiviert. Auch ist es vorstellbar, dass Aldosteron andere, bereits bekannte membrangebundene Rezeptoren bindet und aktiviert. Es scheint jedoch am wahrscheinlichsten, dass ein membrangebundener Rezeptor für die nicht-genomischen Wirkungen eine wichtige Rolle spielt, da diese zumindest zum Teil auch in MR-defizienten, transgenen Mäusen nachgewiesen werden konnten (Berger et al. 1998) (siehe Abbildung 6).

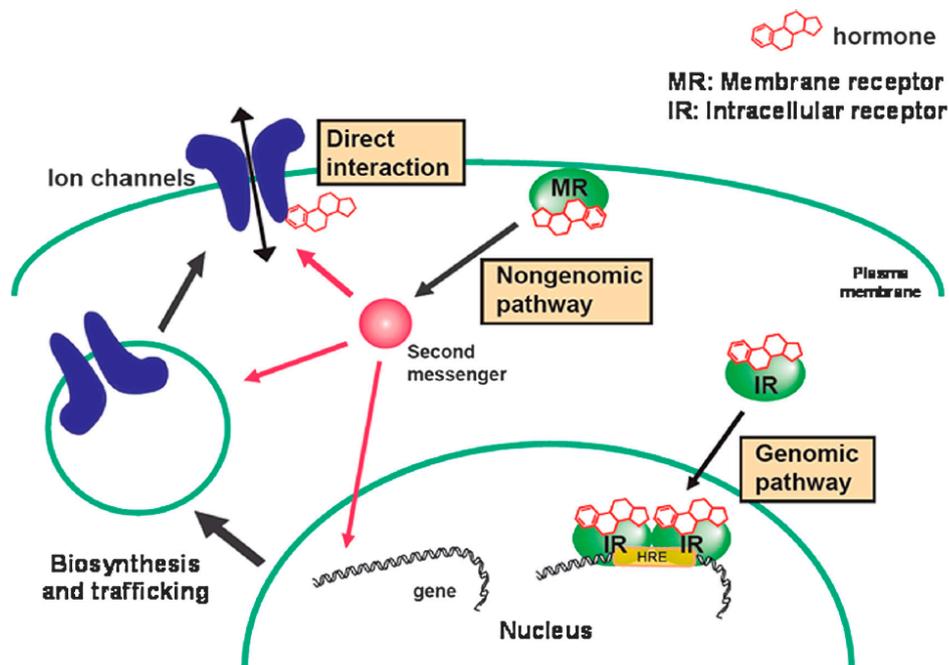


Abbildung 6: Genomische und nicht-genomische Wirkungen von Aldosteron (Kurokawa and Abriel 2009) Aldosteron vermittelt genomische sowie nicht-genomische Wirkungen. Genomische Wirkungen werden klassisch über den intrazellulären MR (IR) vermittelt. Nicht-genomische Wirkungen werden vermutlich über „second messenger“ vermittelt, die nach Bindung an einen membranständigen Rezeptor (MR oder fremder Rezeptor) aktiviert werden. Auch ist es vorstellbar, dass Aldosteron direkt mit bestimmten Ionenkanälen interagiert.

Eine klare und strikte Trennung zwischen genomischen und nicht-genomischen Wirkungen besteht nach dem derzeitigen Wissensstand nicht. Es wird vielmehr angenommen, dass die

schnellen, nicht-genomischen Wirkungen die genomischen Effekte in vielfältiger Weise beeinflussen können (Christ and Wehling 1998). So wurde die akute Aktivierung einer Vielzahl von nachgeschalteten intrazellulären Mediatoren durch Aldosteron beobachtet. Beschrieben wurde unter anderem eine Erhöhung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) (Christ et al. 1995) sowie die nachgeschalteten Erhöhungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Wehling et al. 1994) und der Proteinkinase C (PKC) (Christ et al. 1995; Gekle et al. 1997; Harvey et al. 2002; Mihailidou et al. 2004). Eine Hemmung der PKC mit Calphostin C oder Bisindolylmaleimid I bewirkte eine Hemmung der akuten Effekte von Aldosteron (Gekle et al. 1997; Mihailidou et al. 2004). Aldosteron erhöht die intrazelluläre cAMP Konzentration mit einer EC₅₀ ~ 0,01-0,1 nmol/l in isolierten glatten Muskelzellen (Christ et al. 1999) wahrscheinlich über eine Ca²⁺- und calmodulinabhängige Adenylylcyclase (Zhang et al. 1997). Ein weiterer bedeutsamer „*second messenger*“ für Aldosteron ist Calcium, eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, z.B. durch Freisetzung aus IP₃ sensitiven Speichern oder chronisch über Veränderungen am L-Typ Ca²⁺-Kanal (Benitah and Vassort 1999), wurde mit Aldosteron mehrfach in Verbindung gebracht. Andere „*second messenger*“, die mit den schnellen Effekten von Aldosteron verbunden werden, sind die MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte Proteinkinase), reaktive Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“, ROS) sowie der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor („*Epidermal Growth Factor Receptor*“, EGFR) (Jaffe and Mendelsohn 2005; Mazak et al. 2004). Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass Aldosteron akute Wirkungen auch auf Ionenkanäle entfaltet. Eine entsprechende Regulation erscheint möglich, denn die den genannten Strömen zugrunde liegenden Kanäle besitzen die entsprechenden Voraussetzungen (z.B. Phosphorylierungsstellen), um durch Aldosteron veränderte „*second messenger*“ reguliert zu werden. Der Calciumstrom I_{Ca} wird sowohl durch PKA- als auch PKC-abhängige Phosphorylierung beeinflusst (Kamp and Hell 2000). Auch für den Kaliumstrom I_{to} liegen entsprechende Berichte über eine akute Regulation durch PKC (Wang et al. 2001a) vor. Der

Kaliumstrom I_{K1} wird durch PKC (Sato and Koumi 1995; Henry et al. 1996; Zhu et al. 1999) abhängige Signaltransduktionswege reguliert. Auch wurde kürzlich über die Inhibition der Stromdichte von I_{K1} in menschlichen Vorhöfen nach PKC-abhängiger Phosphorylierung von Kir2.1b berichtet (Karle et al. 2002). Letztlich sind auch für den Kaliumstrom I_{Kur} entsprechende akute Modulationen durch PKC-abhängige Signaltransduktionswege beschrieben (Yue et al. 1999).

Insgesamt wird deutlich, dass sich Aldosteron schädlich auf das kardiovaskuläre System auswirkt, und dass Aldosteronantagonisten nachweislich vor diesen Wirkungen schützen. Zurzeit werden zwei verschiedene Aldosteronantagonisten in der Klinik eingesetzt, Spironolacton und Eplerenon.

2.4 Pharmakologie der Aldosteronantagonisten

2.4.1 Spironolacton

1960 wurde Spironolacton von der Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung des primären Aldosteronismus, bei ödematösen Zuständen, bei essentieller Hypertonie und Herzinsuffizienz sowie bei Hypokaliämie als Kalium-sparendes Diuretikum zugelassen. Eine Kontraindikation besteht bei Patienten mit Serumkaliumspiegeln $>5,5$ mEq/L oder mit einer Creatininclearance von ≤ 30 mL/min.

Spironolacton ist ein strukturell vom Aldosteron abgeleiteter Antagonist des MR und stellt ein 17-Spirolacton-Steroid dar. Strukturelle Voraussetzungen für die Wirkung der Substanz am MR ist die Steroidstruktur (Pregnen) mit einer Ketogruppe an C-3 und einem Lactonring an C-17 sowie der Thioacetat-Gruppe an C-7 (Abbildung 7).

Spironolacton weist strukturelle Elemente des Hormons Progesteron auf. Aus dieser Verwandtschaft heraus ergeben sich antiandrogene Nebenwirkungen der Substanz (Gynäkomastie, Störungen der Libido), die bei ca. 10% der Patienten auftreten und

regelmäßig zum Abbruch der Medikation führen (de Gasparo et al. 1987). Weiterhin weist die Substanz eine 17α -Thioacetat-Gruppe auf, die in der Leber während der Biotransformation aufgespalten wird. Canrenon als aktiver Metabolit enthält noch den intakten Lactonring, der hydrolytisch weiter aufgespalten wird. Die daraus resultierenden Substanzen Canrenonsäure und dessen Kaliumsalz weisen volle diuretische Aktivität, eine längere Halbwertszeit und eine stärkere Plasmaproteinbindung auf (99%) (Takamura et al. 1997). Im Vergleich zu Spironolacton ist das Salz in wässrigen Lösungen gut löslich und daher als intravenöse Injektion verfügbar. Die weiteren Metabolite von Canrenon werden mittels Glutathiontransferasen im Körper entgiftet, im Vergleich zu Spironolacton stehen diese jedoch im Verdacht, kanzerogene Epoxide zu generieren. Spironolacton wird schnell zu drei aktiven Metaboliten verstoffwechselt, die jeweils eine verlängerte Halbwertszeit aufweisen (13,8-16,5 h) (Gardiner et al. 1995). Andere schwefelhaltige Metabolite und Spironolacton selbst werden für die Hauptwirkungen verantwortlich gemacht. Die Wirkung von Spironolacton setzt nach der ersten Applikation relativ langsam ein, oft erst am zweiten Tag und hält bis zu drei Tage an.

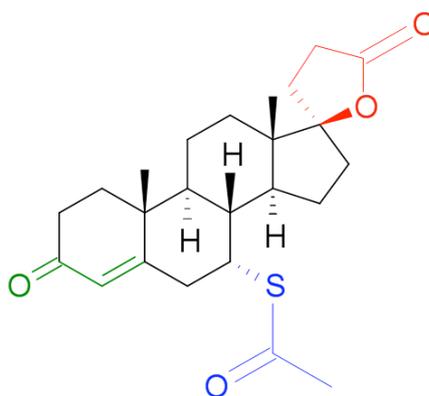


Abbildung 7: Spironolacton

Die Struktur von Spironolacton ist von Aldosteron abgeleitet und stellt ein 17-Spirolacton-Derivat dar. Strukturelle Voraussetzungen für die Wirkung der Substanz am MR ist die Steroidstruktur (Pregnen) (schwarz) mit einer Ketogruppe an C-3 (grün) und einem Lactonring an C-17 (rot) sowie der Thioacetat-Gruppe an C-7 (blau).

2.4.2 Eplerenon

Eplerenon wurde 2003 als selektiver Aldosteronantagonist zur Verbesserung der Überlebensrate bei Patienten mit linksventrikulärer systolischer Dysfunktion (Ejektionsfraktion $\leq 40\%$) und schwerer Herzinsuffizienz nach akutem Myokardinfarkt von der FDA zugelassen. Weiterhin wird die Substanz bei der Behandlung der Hypertonie allein oder in Kombination mit anderen Antihypertensiva in den USA eingesetzt. Kontraindiziert ist Eplerenon bei Patienten mit Serumkaliumspiegeln $>5,5$ mEq/L oder mit einer Creatininclearance von ≤ 30 mL/min und bei Patienten mit Nieren- oder Leberinsuffizienz sowie bei Patienten, die potente CYP3A4 Inhibitoren (Ketoconazol, Itraconazol, Ritonavir, Nelfinavir, Clarithromycin, Telithromycin und Nefazodon) erhalten.

Eplerenon stellt eine Derivat des Spironolacton dar (Abbildung 8), das mit dem Ziel entworfen wurde, die selektive Bindung am MR zu erhöhen und gleichzeitig die Bindung an Progesteron- und Androgenrezeptoren zu vermindern (de Gasparo et al. 1987). Verglichen mit Spironolacton ist die Affinität von Eplerenon für den MR 20-fach geringer, trotzdem beträgt die in vivo Dosis von Eplerenon, mit der die Aldosteronbindung um 50% gehemmt wird, nur die Hälfte der hierfür benötigten Spironolactondosis (de Gasparo et al. 1987). Erklärt wird diese Beobachtung durch die im Vergleich zu Spironolacton höhere Bioverfügbarkeit und die niedrigere Plasmaproteinbindung von Eplerenon. Betrachtet man die Glukokortikoid-, Progesteron- und Aldosteronrezeptoren, zeigt Eplerenon eine 100- bis 1000-fach niedrigere Bindungsaffinität. Beide Substanzen unterscheiden sich ebenfalls deutlich im Hinblick auf ihre Metabolisierung und Elimination. Eplerenon wird ebenfalls rasch metabolisiert, aber die Abbauprodukte sind inaktiv. Die Halbwertszeit von Eplerenon selbst beträgt 3,5-5 h. Die chemische Struktur unterscheidet sich von Spironolacton darin, dass Eplerenon eine $9\alpha,11\alpha$ -Epoxy-Gruppe aufweist und die 17α -Thioacetat-Gruppe durch eine Carbomethoxygruppe substituiert ist, wodurch die Selektivität gegenüber des MR erhöht werden konnte (Abbildung 8). Dies führt zu einer geringeren Inzidenz von antiandrogenen Nebenwirkungen. Die

Absorption von Eplerenon wird durch Nahrungsaufnahme nicht beeinträchtigt, so dass die mittlere höchste Plasmakonzentration nach 1,3 h nach einer oralen Einzeldosis von 100 mg zu erwarten ist (Zillich and Carter 2002). Das Verteilungsvolumen im Steady-State liegt zwischen 43 und 90 L (Davis and Nappi 2003). Da die Hauptmetabolisierungsrouten *in vitro* und *in vivo* zu inaktiven Abbauprodukten (6 β -Hydroxy- und 21-Hydroxyeplerenon) über Cytochrom P450-3A4 führt (Cook et al. 2002), können die Plasmakonzentrationen von Eplerenon fünfmal erhöht sein, wenn gleichzeitig potente CYP3A4 Inhibitoren wie Ketoconazol oder Itraconazol appliziert werden. Weniger potente CYP3A4 Inhibitoren wie Saquinavir, Fluconazol oder Verapamil führen bei gleichzeitiger Gabe zu einem zweifachen Anstieg der Plasmakonzentration. In Folge dessen sollte die Applikationsdosis reduziert werden (Sica 2005). Eplerenon selbst hat keinen Effekt auf CYP3A4 oder andere Cytochrom P450 Isoformen, so dass es keine Auswirkungen auf andere CYP3A4 Substrate gibt (Cook et al. 2004). Die Eliminationshalbwertszeit der aktiven Substanz liegt bei 4-6 h (Zillich and Carter 2002). Eplerenon kann zu circa 67% nach oraler Applikation im Urin und zu 32% im Fäces nachgewiesen werden (Stier, Jr. 2003). Steady state Bedingungen werden innerhalb von zwei Tagen erreicht (Davis and Nappi 2003).

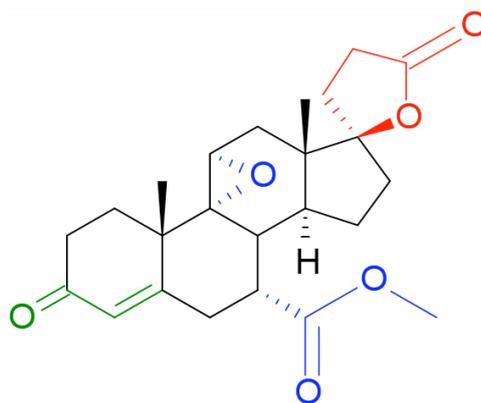


Abbildung 8: Eplerenon

Die Struktur des Aldosteronantagonisten unterscheidet sich von Spironolacton darin, dass eine 9 α ,11 α -Epoxy-Gruppe (blau oben) vorliegt und die 17 α -Thioacetat-Gruppe durch eine Carbomethoxygruppe (blau unten) substituiert ist, wodurch die Selektivität gegenüber des MR erhöht und somit das Auftreten von antiandrogenen Nebenwirkungen verringert werden konnte.

| | Spirolacton (100mg) | Eplerenon (100mg) |
|---------------------------|---|--------------------------------------|
| Absorption | | |
| - Bioverfügbarkeit | 73% | ~ 98% |
| - C _{max} | 80 ng/mL | 1721± 290 ng/mL |
| - T _{max} | 2,6 h | 1,3 h |
| - AUC | nicht bestimmbar | 9537 ± 3201 mg/mL/h |
| Distribution | | |
| - steady state | nach 3-6 Tagen | nach 2 Tagen |
| - Volumen im steady state | nicht bestimmbar | 43-90 L |
| - Plasma-Protein-Bindung | > 90% | 50% (α 1-acid glycoproteins) |
| Metabolismus | | |
| - Route | komplex | CYP 3A4 |
| - aktive Metabolite | Canrenon 7- α -(thiomethyl)-Spirolacton 6- β -Hydroxy-7 α -(thiomethyl)-Spirolacton | nicht bekannt |
| Elimination | | |
| - Route | Primär: renal Sekundär: biliär | 67% renal 32% Faeces |
| - t _{1/2} | 1,4 h (Spirolacton) 13,8-16,5 h (Metabolite) | 4-6 h |
| - Plasma Clearance | nicht bestimmbar | 10 L/h |
| IC 50 (MR) | | |
| | 0,002 μ M | 0,081 μ M |

Tabelle 1: Pharmakokinetik der Aldosteronantagonisten

2.4.3 Klinische Wirksamkeit der Aldosteronantagonisten

Sowohl die Monotherapie mit Spironolacton als auch mit Eplerenon konnte in zahlreichen Studien eine effektive Blutdrucksenkung bewirken (Croom and Perry 2005; Jeunemaitre et al. 1987). Dies gilt auch für die Kombination mit anderen Antihypertensiva (Croom and Perry 2005; Sternon 1990). Nur wenige Studien untersuchten primär, inwieweit Endorganschäden durch die Aldosteronantagonisten beeinflussbar sind. So konnte für Eplerenon gezeigt werden, dass es die linksventrikuläre Masse (Pitt et al. 2003a) und das Ausmaß einer Mikroalbuminurie (White et al. 2003) vermindern kann. Für Spironolacton liegen keine entsprechenden Daten vor. Kürzlich konnte allerdings gezeigt werden, dass die Gabe von 25 mg Spironolacton täglich als viertes Antihypertensivum bei Patienten mit essentieller Hypertonie und nicht ausreichender Blutdruckeinstellung eine Drucksenkung um 21,9 mmHg bewirken konnte (Chapman et al. 2007). Somit handelt es sich bei beiden Substanzen um effektive Antihypertensiva, die unter Beachtung der Nebenwirkungen (Hyperkaliämie, Gynäkomastie) sinnvoll eingesetzt werden können.

Beide Aldosteronantagonisten haben ihre Wirksamkeit in unterschiedlichen Populationen von Patienten mit Herzinsuffizienz überzeugend dargelegt. In der *“Randomized Aldactone Evaluation Study”* (RALES) (Pitt et al. 1999) und der *“Eplerenone Post-acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study”* (EPHESUS) (Pitt et al. 2003b) reduzierten beide Substanzen signifikant die Morbidität und Mortalität der herzinsuffizienten Patienten. In RALES verminderte eine mittlere Tagesdosis von 26 mg Spironolacton zusätzlich zu einer Herzinsuffizienztherapie das relative Risiko an irgendeiner Ursache zu versterben um 30% im Vergleich zu der Placebogruppe. In EPHESUS kam es unter der Therapie mit einer mittleren Dosis von 43 mg Eplerenon zu einer relativen Abnahme der Gesamtsterblichkeit um 15%. Auf Basis der genannten Studien besteht eine Indikation für Eplerenon bei Patienten mit Zustand nach akutem Myokardinfarkt und einer Ejektionsfraktion

unter 40%, wohingegen bei chronischer fortgeschrittener Herzinsuffizienz jeglicher Ursache Spironolacton indiziert ist.

Beide Substanzen führen dosisabhängig zu einem Anstieg der Kaliumspiegel. Das Risiko für eine klinisch relevante Hyperkaliämie ist naturgemäß bei Patienten mit vorbestehender Niereninsuffizienz deutlich erhöht. In der RALES Studie war die Rate der Patienten, die Spironolacton erhielten, mit einem Kaliumwert über 6 mmol/l mit 2% nicht signifikant höher als in der Placebogruppe (1%). Betrachtet man die EPHEBUS Studie, dann zeigten hier 5,5% gegenüber 3,9% der Patienten eine schwere Hyperkaliämie bei Therapie mit Eplerenon. Dieser Unterschied war signifikant. Da es keine Vergleichsstudien beider Substanzen in Bezug auf diese Nebenwirkung gibt und sich die Studienpopulationen deutlich unterscheiden, können aus diesen Ergebnissen keine Rückschlüsse auf die Überlegenheit einer Substanz gezogen werden. Es gilt bei beiden Substanzen, dass ein engmaschiges Monitoring der Elektrolyte insbesondere bei Beginn einer Therapie unbedingt notwendig ist.

2.5 Signaltransduktion

2.5.1 Calcineurin

Calcineurin ist eine zytoplasmatische Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase (PP2B), die sich aus einem Heterodimer zusammensetzt. Dieses besteht aus einer katalytischen A-Untereinheit und einer regulatorischen B-Untereinheit. Die katalytische A-Untereinheit besitzt eine N-terminale katalytischen Domäne/ Phosphatase-Domäne mit einem katalytischen Kern, der eine Sequenzhomologie zu der Proteinphosphatase 1 (PP1) und Proteinphosphatase 2 (PP2A) enthält und am C-Terminus eine Calmodulin-bindende Domäne sowie eine autoinhibitorische Domäne. In Säugetieren kodieren drei unabhängige Loci für die katalytische Untereinheit (CnA α , CnA β und CnA γ) und zwei Loci für die regulatorische Untereinheit (CnB1 und CnB2). Calcineurin wird durch den intrazellulären Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration aktiviert und ist ubiquitär in einer Vielzahl

von Geweben exprimiert. Die Calcineurin-gesteuerte Signaltransduktion ist bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie beteiligt (Molkentin et al. 1998). Die Aktivierung von Calcineurin im Herzen resultiert in einer Dephosphorylierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren (NFAT= *Nuclear Factor of activated T-cells*) im Zytoplasma, die in den Zellkern translozieren. Dort werden bestimmte Zielgene aktiviert, die eine Hypertrophie und Herzinsuffizienz induzieren (Molkentin et al. 1998).

In Mäusen, die eine Hypertrophie durch Druckbelastung des Herzens entwickelten, konnte gezeigt werden, dass die Calcineurinblockade mit dem selektiven Antagonisten Cyclosporin A die Ausbildung der Hypertrophie verhindern konnte (Hill et al. 2000). Dagegen konnte Cyclosporin A in einem Mausmodell mit Aortenstenose, die eine Hypertrophie entwickelten, diese nicht verhindern. In den linken Ventrikeln der Tiere kam es nach vierwöchiger Aortenstenose zu einer Abnahme der Calcineurinaktivität (Ding et al. 1999). Im Rattenmodell wurde nach Ausbildung einer Aldosteron induzierten Hypertrophie eine Aktivierung des Calcineurinsignalweges gezeigt (Takeda et al. 2002b), ebenso in kultivierten Rattenkardiomyozyten (Mano et al. 2004). Der Einfluß der Calcineurinsignaltransduktion bei der Entstehung einer Hypertrophie und im Zusammenhang mit Aldosteron ist zum Teil widersprüchlich und bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Daher wird in dieser Arbeit der Einfluß einer chronischen Aldosteronstimulation auf die Calcineurinaktivität und -expression im Herzen untersucht.

2.5.2 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen und spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Signaltransduktion. In verschiedenen *in vivo* und Zellkulturexperimenten konnte ein Zusammenhang der PKC mit der Proliferation, dem Überleben und dem programmierten Tod der Zellen gezeigt werden (Dorn and Force 2005). In kultivierten Kardiomyozyten reguliert die PKC die Kontraktilität und Hypertrophie (Dorn and Mochly-Rosen 2002). Die PKC-Familie besteht aus mindestens 11 verschiedenen

Isoformen, die eine Vielzahl verschiedener zellulärer Antworten abhängig von der Aktivität der Isoformen und dem physiologischen Kontext steuern. Unterteilt werden die PKC Gruppen in die der konventionellen PKC (PKC- α , - β 1, - β 2, - γ), die Ca^{2+} -abhängig ist und die durch Bindung an Diacylglycerol (DAG) und Phosphatidylserin aktiviert wird und in die Gruppe der neuen PKC (PKC- δ , - ϵ , - η und - θ) die Ca^{2+} -unabhängig ist, aber durch DAG und Phosphatidylserin aktiviert wird und schließlich in die Gruppe der atypischen PKC (PKC - ζ und - λ), die Ca^{2+} - und DAG-unabhängig ist und nur durch Phosphatidylserin aktiviert wird (Naruse and King 2000). In kardialem Gewebe unterscheidet sich die Expression der einzelnen PKC-Isoformen anhand der Spezies, des Zelltyps und dem Entwicklungsstadium. So werden im Myokard adulter Säugetiere die Isoformen PKC- α , - β 1, - β 2, - δ , - ϵ und - λ/ζ exprimiert (Sabri and Steinberg 2003; Bowling et al. 1999). Die Aktivität der einzelnen PKC Isoformen ist abhängig vom Expressionslevel, der Lokalisation in der Zelle und dem Phosphorylierungsstatus (Malhotra et al. 2001). Jeder dieser Faktoren ist bei kardialen Erkrankungen reguliert, wobei die Coexpression sowie die parallele Aktivierung verschiedener PKC Isoformen und gegenseitige Beeinflussung und Wechselwirkungen der Isoformen die Bestimmung der PKC Signalwirkungen erschweren. Neben den genannten komplexen Vorgängen und den Unterschieden in experimentellen Studien und bei humanen Syndromen, berichten viele Studien bei der Entstehung der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz ähnliche Ergebnisse. So scheinen unter diesen Bedingungen PKC- α und PKC- β hochreguliert zu sein, wohingegen PKC- ϵ entweder hochreguliert vorliegt oder vorrangig aktiviert ist und PKC- δ und - λ/ζ keine veränderten Expressionslevel aufweisen (Bowling et al. 1999; Wang et al. 1999a; Wang et al. 2003). Im adulten Rattenherz sind hauptsächlich die PKC- α , - δ und - ϵ sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimiert (Puceat et al. 1994). In den Herzen von Ratten kommt es in der frühen Phase bei der Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie zu einer erhöhten mRNA- und Proteinexpression von PKC- α und - δ , wohingegen PKC- ϵ auf Proteinebene keine

Veränderungen aufweist. In dieser Studie konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte PKC-Aktivität bestimmt werden (Braun et al. 2002). Transgene Mäuse, die eine spezifische Überexpression von PKC- ϵ im Herzen aufweisen, entwickeln eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels bei normaler *in vivo* Funktion (Takeishi et al. 2000). PKC- ϵ *knock-out* Mäuse weisen nach chronischer Druckbelastung des Herzens nach kontrollierter Banding-Operation der Aorta thoracalis vermehrt interstitielle Fibrose und Kollagenablagerungen im Herzen auf (Klein et al. 2005). Dagegen entwickeln PKC- δ *knock-out* Mäuse keinen kardialen Phänotyp, zeigen aber Veränderungen in der metabolischen Aktivität im Herzen (Miyamoto et al. 2002; Mayr et al. 2004).

Im Zusammenhang mit Aldosteron liegen einzelne experimentelle Studien vor, die jedoch fast ausschließlich akute Effekte untersuchten. So wurde von einer Aktivierung zweier PKC Isoformen nach akuter Aldosteronstimulation berichtet. In neonatalen Rattenkardiomyozyten kommt es zu einer Aktivierung von PKC- α (Christ et al. 1995; Okoshi et al. 2004), wohingegen PKC- ϵ bei Aldosteron-vermittelten Effekten in Kardiomyozyten des Kaninchens involviert ist (Mihailidou et al. 2004). Im Gegensatz dazu reduziert Aldosteron akut die PKC-Aktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten, was durch Aldosteronantagonismus mit Spironolacton nicht verhindert werden kann (Sato et al. 1997). Studien über einen chronischen Einfluß von Aldosteron auf die PKC-Isoformen im Herzen liegen nicht vor.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Substanzen und allgemeine Lösungen

| | |
|---------------------------------|---|
| Aldosteron Reinsubstanz | Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA |
| Polyethylenglycol 400 (PEG-400) | Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA |
| Osmotische Pumpen | Modell 2004, ALZET [®] , Durect Corporation, Cupertino, USA |
| Spirolacton Reinsubstanz | Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen |
| Eplerenon Reinsubstanz | Pfizer, New York, USA |
| Tierfutter | Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage |
| Ketamin | Ketavet [®] , 100mg/ml, Sanofi-Ceva GmbH, Düsseldorf |
| Xylazin | Rompun [®] 2%, 20mg/ml, Bayer Vital, Leverkusen |
| Carprofen | Rimadyl [®] , 50mg/ml, Pfizer Pharma GmbH, Berlin |
| Polyamidfaden | Ethicon [®] , 3-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt |
| 0,9%ige NaCl Lösung | Berlin-Chemie AG, Berlin |
| Aqua dest. (AMPUWA) | Fresenius Kabi AG, Bad Homburg |

3.1.2 Reagenzien

3.1.2.1 RNA Extraktion und Umschreiben in cDNA

| | |
|--|---|
| peq-Gold RNA Pure™ | Peqlab Biotechnology, Erlangen |
| Chloroform (M _r 119,38 g/mol) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Isopropanol (M _r 60,10 g/mol) | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Ethanol (M _r 46,07 g/mol) | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit | Fermentas International Inc., Ontario, Kanada |
| RNAse freies H ₂ O | Qiagen GmbH, Hilden |

3.1.2.2 Realtime-PCR Reagenzien

Applied Biosystems Inc., Foster City, USA:

TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG

Verwendete TaqMan[®] Gene Expression Assays:

| Bezeichnung | Gene Expression Assay |
|------------------------------------|-----------------------|
| β2-Microglobulin (β2m) | Rn00560865_m1 |
| ANP (Nppa) | Rn00561661_m1 |
| Kv4.2 (Kcnd2) | Rn00581941_m1 |
| Kv4.3 (Kcnd3) | Rn00709608_m1 |
| Kir2.1 (Kcnj2) | Rn00568808_s1 |
| Kir2.2 (Kcnj12) | Rn01464023_m1 |
| Kir2.3 (Kcnj4) | Rn00821554_m1 |
| Kv1.5 (Kcna5) | Rn00564245_s1 |
| Ca _v 1.2 (α1c, Cacna1c) | Rn00709287_m1 |
| PKC-α (Prkca) | Rn01496145_m1 |
| PKC-δ (Prkcd) | Rn00440891_m1 |
| PKC-ε (Prkce) | Rn01769089_m1 |
| PPP3cb (Calcineurin Aβ) | Rn01536981_m1 |

3.1.2.3 Western Blot Reagenzien und Lösungsansätze

Western Blot Reagenzien:

| | |
|---|--------------------------------------|
| D(+)-Saccharose | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄) | Merck KGaA, Darmstadt |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Rotiphorese [®] -Gel 30 | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Glycin | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |

| | |
|---|--|
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Rinderserumalbumin (BSA) | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| Bradfordreagenz | BioRad Laboratories GmbH, München |
| Tris-HCl | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Glycerol | Caelo, Caesar & Loretz GmbH, Hilden |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Merck KGaA, Darmstadt |
| 2-Mercaptoethanol | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Bromphenolblau, Natriumsalz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder | Fermentas Life Sciences, #SM 1811 |
| Methanol | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Ponceau-S | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Trichloressigsäure | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Sulfosalicylsäure | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Bio-Magermilchpulver | Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell |
| Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Kaliumchlorid (KCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Tween® 20 | Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe |
| Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Nonidet P-40 (NP-40) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |

Antikörper (AK):

Primär-AK

Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel:

| <u>Antikörper</u> | <u>Bestellnr.</u> |
|------------------------------------|-------------------|
| Anti-Kv1.5 (<i>KCNA5</i>) | APC-004 |
| Anti-Kv4.2 (<i>KCNA2</i>) | APC-023 |
| Anti-Kv4.3 (<i>KCNA3</i>) | APC-017 |
| Anti-Kir2.1 (<i>IRK1, KCNJ2</i>) | APC-026 |
| Anti-Kir2.3 (<i>IRK3, KCNJ4</i>) | APC-032 |

Anti-Ca_v1.2 (*α1c, L-Typ*) ACC-022

Abcam PLC, Cambridge, Großbritannien:

Antikörper Bestellnr.

Anti-GAPDH (HRP) ab9482

(konjugiert mit Horse Radish Peroxidase)

Sekundär-AK: Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate, A6154,
Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

| | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Lumi-Light Western Blotting Substrate | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim |
| Entwickler G138i | AGFA Healthcare NV, Mortsel, Belgien |
| Fixierer G334i | AGFA Healthcare NV, Mortsel, Belgien |

Lösungsansätze:

Präparationspuffer (pH 7,4):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 300 mM | D(+)-Saccharose |
| 1 mM | PMSF |
| 20mM | PIPES |
| 10mM | EDTA |
| 50mM | NaH ₂ PO ₄ |

Gefrierpuffer (pH 7,2):

| | |
|--------|----------------------------------|
| 400 mM | Saccharose |
| 5 mM | HEPES |
| 5 mM | Tris |
| 10 mM | EDTA |
| 50 mM | NaH ₂ PO ₄ |

| <u>Zusammensetzung</u> | <u>Trenngel (10%)</u> | <u>Sammelgel (4%)</u> |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|
|------------------------|-----------------------|-----------------------|

| | | |
|------------------------------|----------|---------|
| Aqua dest. | 28,35 ml | 15,0 ml |
| 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 | - | 6,3 ml |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | 17,5 ml | - |
| 10% SDS (w/v) | 700 µl | 250 µl |
| 30% Acrylamid (Rotiphorese®) | 23,00 ml | 3,3 ml |
| TEMED | 35 µl | 25 µl |
| 10% APS | 350 µl | 200 µl |
| Gesamtvolumen | 70 ml | 25 ml |

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

90,75 g Tris-HCl
ad 500 ml mit Aqua dest.

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

30,0 g Tris-HCl
ad 500 ml mit Aqua dest.

Probenpuffer

| | |
|--------------------------|---------------|
| 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 | 20,0 ml |
| Glycerol | 16,0 ml |
| 10% SDS | 32,0 ml |
| 2-Mercaptoethanol | 8,0 ml |
| <u>1% Bromphenolblau</u> | <u>8,0 ml</u> |
| Gesamtvolumen | 84,0 ml |

Elektrophoresepuffer (10x Stock)

250 mM Tris-Base
2,5 M Glycin
1 % SDS (w/v)

für die Elektrophorese: 500 ml 10x Laufpuffer + 4500 ml Aqua dest.

Blotpuffer (10x Stock)

250 mM Tris-Base
1,5 M Glycin

für das Blotten: 150 ml 10x Blotpuffer + 300 ml Methanol + 1050 ml Aqua dest.

Ponceau-S Stammlösung konzentriert:

2% Ponceau-S71 (w/v)
30% Trichloressigsäure (w/v)
30% Sulfosalicylsäure (w/v)

ad 100 ml mit Aqua dest.

für den Gebrauch 1:10 verdünnen

PBS 10x Stock (1 L, pH 7,4)

1,37 M NaCl
 100 mM Na₂HPO₄, H₂O-frei
 27 mM KCl
 20 mM KH₂PO₄, H₂O-frei

PBS 1x

100 ml 10x PBS
 ad 1000 ml mit Aqua dest.

PBST 1x

100 ml 10x PBS
 + 1 ml Tween[®] 20
 ad 1000 ml mit Aqua dest.

TBS 10x Stock (1 L, pH 7,6)

500 mM Tris-Base
 2 M NaCl

TBS 1x

100 ml 10x TBS
 ad 1000 ml mit Aqua dest.

TBST 1x

100 ml 10x TBS
 + 1 ml Tween[®] 20
 ad 1000 ml mit Aqua dest.

10% SDS

100 g SDS
 ad 1000 ml mit Aqua dest.

10% APS

1 g APS
 Ad 10 ml mit Aqua dest.

3.1.2.4 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

| | |
|-----------------------|---|
| Glutardialdehydlösung | Merck KGaA, Darmstadt |
| Cacodylatpuffer | Acros Organics, Geel, Belgien |
| Osmiumsäure | ChemPur, Karlsruhe |
| Uranylacetat | Ted Pella Inc., Redding, USA/ Plano GmbH, Wetzlar |
| Epon | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |

3.1.2.5 Lösungen für die Calcineurinaktivitätsbestimmung

Calcineurin Cellular Assay Kit Plus AK-816, Biomol[®] International LP, Plymouth
 Meeting, USA

Lysepuffer, pH 7,5

50 mM Tris-Base
 0,1 mM EDTA
 0,1 mM EGTA
 1 mM DTT
 0,2 % NP-40

ad 500 ml mit Aqua dest.

3.1.3 Geräte und Software

3.1.3.1 Blutdruckaufzeichnung

| | |
|--------------|---|
| Aufzeichnung | Rat Tail Blood Pressure + Monitor, Harvard Apparatus Ltd, Edenbridge Kent, England |
| Schreiber | Thermal Array Recorder, Gould Instrument Systems TA 10, Cleveland, USA |

3.1.3.2 EKG-Aufzeichnung

Data Sciences International (DSI), St. Paul, USA:

| | |
|------------------|--|
| Telemetriesender | TA10 ETA-F20 |
| Empfänger | Receiver-Platte, RPC-1 |
| Multiplexer | Data Exchange Matrix |
| Analyseeinheit | Data Acquisition and Analysis |
| Analyseprogramm | Dataquest A.R.T. Analysis Program, Version 4.1 |

3.1.3.3 Elektrolyt- und Creatininbestimmung aus dem Plasma

Mikro-Probengefäße, Lithium-Heparin Plasma (1,3 ml) Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.1.3.4 MKG-Aufzeichnung

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Sieben-Kanal-Magnet-Messanlage | Cryoton Ltd., Moskau, Russland |
| EKG Gerät Cardiofax Q | Nihon Kohden, Rosbach |

3.1.3.5 RNA Extraktion

| | |
|-----------------------------------|--|
| Elektrischer Homogenisator | Ultra-Turrax, IKA Works, Staufen |
| Spektrophotometer | Nanodrop ND-1000, WITEC, Littau, Schweiz |
| Multifuge 3 S-R Heraeus | Kendro, Osterode |
| Hettich Zentrifugen Universal 30F | Hettich, Tuttlingen |

3.1.3.6 Realtime PCR

Applied Biosystems Inc, Foster City, USA:

7300 Real-Time PCR System

AbiPrism® 96-Well Optical Reaction Plates

3.1.3.7 Western Blot

| | |
|-------------------------|---|
| Bradford-Bestimmung: | ELISA-Reader, MRX Microtiterplatten, TPP Zellkultur Testplatte 96F, Schweiz |
| Thermo(heiz)block | Eppendorf Thermomixer 5436 |
| Elektrophoresekammer | Hoefler SE 600; Hoefler Scientific Instruments, San Francisco, USA |
| Elektrophoresenetzgerät | Serva Blue Power 500, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Nitrocellulosemembran | 0,2 µm, Bio-rad Trans-Blot® Transfer Medium, BioRad Laboratories, USA |
| Whatman®-Papier | Whatman GmbH, Dassel |
| Blotkammer | BioRad Criterion™ Blotter |
| Entwicklergerät | Curix 60, Agfa Healthcare NV, Mortsel, Belgien |
| Filme | Curix HT 1.000 G Plus, Medical X-Ray Film, Agfa Healthcare NV, Mortsel, Belgien |

3.1.3.8 Elektronenmikroskopie

| | |
|-----------------------------------|--------------------|
| Ultramikrotom | Leica Ultracut UTC |
| Photomikroskop | Leica |
| Zeichenmikroskop | 1120-88970 Wild |
| Transmissions-Elektronenmikroskop | EM10, Zeiss |

3.2 Methoden

3.2.1 Tiere

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 9 Absatz 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes nach Genehmigung des Antrages auf Erteilung einer Ausnahmegenehmigung für Eingriffe bzw. Behandlungen an Wirbeltieren durch die Bezirksregierung Köln für das Versuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen K 47, 03/05.

Für die Versuchsreihen wurden 48 männliche Wistar Ratten (Charles River) mit einem mittleren Körpergewicht von $211\text{g} \pm 18\text{g}$ verwendet. Dies entsprach einem Alter von 7-8 Wochen. Die Ratten wurden im Tierstall untergebracht und unterlagen einem konventionellen 12 h Tag-Nacht Rhythmus, wobei der Tag um 6 Uhr begann und um 18 Uhr endete. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Weitere Angaben zu der Gruppeneinteilung der Tiere sind in Kapitel 3.2.5 zu finden.

3.2.2 Aldosterondosis

Aldosteron wurde als Festsubstanz bezogen und für das Befüllen der Pumpen in Polyethylenglycol-400 gelöst (Will et al. 1980; Magliola et al. 1986; Fukushima et al. 2004; Smith and Jones 1990). Die verwendete Aldosterondosis ($1\ \mu\text{g}/\text{h}$) wurde in einem Vorversuch bestimmt und anhand früherer Publikationen ausgewählt (Garwitz and Jones 1982; Yoshida et al. 2005; Iglarz et al. 2004).

3.2.3 Pumpen

Die verwendeten osmotischen Pumpen (ALZET[®], Abbildung 9) geben über einen Zeitraum von 28 Tagen ein Gesamtvolumen von $200\ \mu\text{l}$ frei. Die Freisetzungsrates beträgt $0,25\ \mu\text{l}/\text{hr}$ ($\pm 0,05\ \mu\text{l}/\text{hr}$). Die Berechnung des für die Aldosteronfreisetzung ($1\ \mu\text{g}/\text{h}$) benötigten Volumens erfolgte anhand der einzelnen Chargen der Pumpen (Tabelle 2). Um eine korrekte Füllung der Pumpen zu gewährleisten, wurde das Leer- sowie das Füllgewicht der Pumpen ermittelt, so

das das Nettogewicht der Lösung bestimmt werden konnte. Wenn dieses unter Berücksichtigung der Dichte der Lösung im Bereich zwischen 90% und 100% lag, konnten die Pumpen verwendet werden, andernfalls wurde das Befüllen wiederholt. Durch die Viskosität der Aldosteronlösung war es notwendig, die Pumpen vor der Implantation mindestens 40 h in steriler Kochsalzlösung bei 37°C zu inkubieren, um eine sofortige und gleichmäßige Freisetzung der Lösung zu ermöglichen. Weiterhin wurden einige der Pumpen umgerüstet, um für den Gebrauch im Magnetfeld (MKG) verwendet werden zu können. Dabei wurde der Edelstahl *Flow Moderator* durch nicht-metallisches Material (PEEK™= Polyetheretherketon-Röhrchen) unter sterilen Bedingungen ausgetauscht.

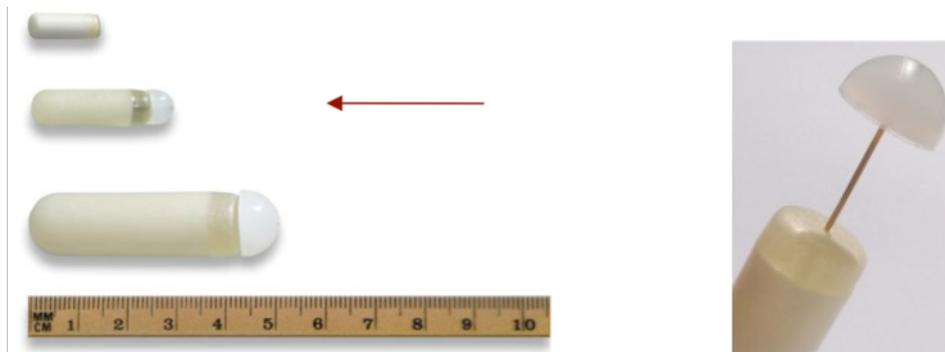


Abbildung 9: Verwendetes Pumpenmodell 2004 (ALZET®) (links)

Die Pumpen wurden für die Verwendung im Magnetfeld umgebaut, indem der metallhaltige *Flow Moderator* durch ein nicht-metallisches Polyetheretherketon-Röhrchen ausgetauscht wurde (rechts).

| | | | |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Lot-Nummer | 10135-05 | 10159-06 | 10172-07 |
| Mittlere Pumprate | 0,20 µl/h | 0,28 µl/h | 0,29 µl/h |
| Standardabweichung (SD) | 0,01 µl/h | 0,01 µl/h | 0,02 µl/h |
| Mittleres Füllvolumen | 246,6 µl | 244,6 µl | 247,7 µl |
| SD | 4,8 µl | 5,6 µl | 6,0 µl |

Tabelle 2: Verwendete Chargen des Pumpenmodells 2004

3.2.4 Tierfutter

Das verabreichte Tierfutter wurde von der Firma Altromin[®] bezogen. Bei der verwendeten Futtermischung für die Kontrolltiere handelte es sich um eine Kontrolldiät für Ratten (C 1000). Zu dieser Kontrolldiät wurden 1,8 g Spironolacton bzw. Eplerenon als Reinsubstanz pro Kilogramm Futter beigemischt. Dies entsprach bei einem mittleren Rattengewicht von 270 g und einer durchschnittlichen Nahrungsaufnahme von 15 g Futter pro Tag einer mittleren Tagesdosis eines Aldosteronantagonisten von 100 mg pro Kilogramm Körpermasse.

3.2.5 Operationsmethode und Einteilung der Tiergruppen

Männliche Wistar Ratten wurden in sechs Gruppen unterteilt (n=8 pro Gruppe). Nach einer Eingewöhnungszeit von einer Woche wurde 24 Tieren jeweils eine osmotische Pumpe subkutan implantiert, die Aldosteron mit einer Freisetzungsrate von 1 µg/h über einen Zeitraum von vier Wochen freigab. Acht dieser Tiere erhielten Kontrollfutter (ALD), die restlichen Tiere bekamen entweder mit Eplerenon- (ALD+EPL, n=8) oder mit Spironolactonversetztes Futter (ALD+SPI, n=8). Weitere 24 Tiere wurden ebenfalls mit einer osmotischen Pumpe ausgestattet, die allerdings nur das für die Aldosteronlösung verwendete Lösungsmittel Polyethylenglycol 400 enthielt. Auch diesen Tieren (je n=8) wurde über einen Zeitraum von vier Wochen entweder Kontroll- (CON), Eplerenon- (EPL) oder Spironolacton-Futter (SPI) verabreicht.

Vor Implantation der osmotischen Minipumpen (Abbildung 10) erhielten die Ratten zur Narkose eine Mischung aus 50 mg pro kg Körpergewicht Ketamin und 7 mg pro kg Körpergewicht Xylazin. Anschließend wurde zwischen den Schulterblättern der Ratten ein Hautschnitt durchgeführt. Nach der Ausformung einer subkutanen Tasche mithilfe einer stumpfen Kanüle konnte die Pumpe platziert werden. Der Hautschnitt wurde mit Wundklammern geschlossen und desinfiziert.

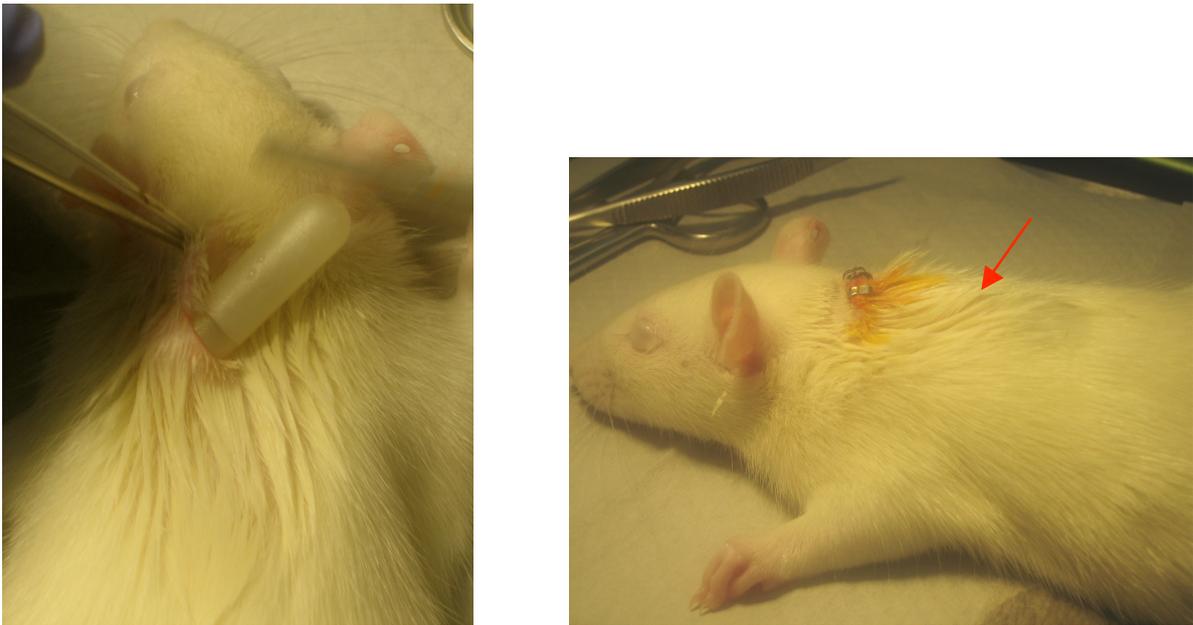


Abbildung 10: Subkutane Implantation der osmotischen Minipumpe

Unter Ketamin/Xylazin-Narkose wird die Pumpe in eine vorgeformte subkutane Tasche eingebracht (links). Mit Wundklammern wird der Hautschnitt geschlossen und desinfiziert. Der rote Pfeil zeigt die Lage der Pumpe nach OP an (rechts).

3.2.6 Blutdruckbestimmung

Der systolische Blutdruck wurde vor Implantation der osmotischen Pumpen (Tag 0) sowie vier Wochen nach Aldosterongabe (Tag 28) nicht-invasiv bei allen Ratten bestimmt. Dazu wurden die wachen Tiere in einen *Restrainer* (= Halterung) überführt und nach einer Gewöhnungszeit von 15 Minuten wurde am Schwanz der Tiere eine Blutdruckmanschette (Manschettenweite: 9,5) circa 1 cm von der Schwanzwurzel entfernt angebracht, so dass über einen Schreiber die Druckkurve sowie die Pulskurve aufgezeichnet werden konnten. Der systolische Blutdruck konnte daraufhin aus den Aufzeichnungen ermittelt werden (Abbildung 11). Pro Tier wurden drei verwertbare Messungen aufgenommen und manuell ausgewertet.

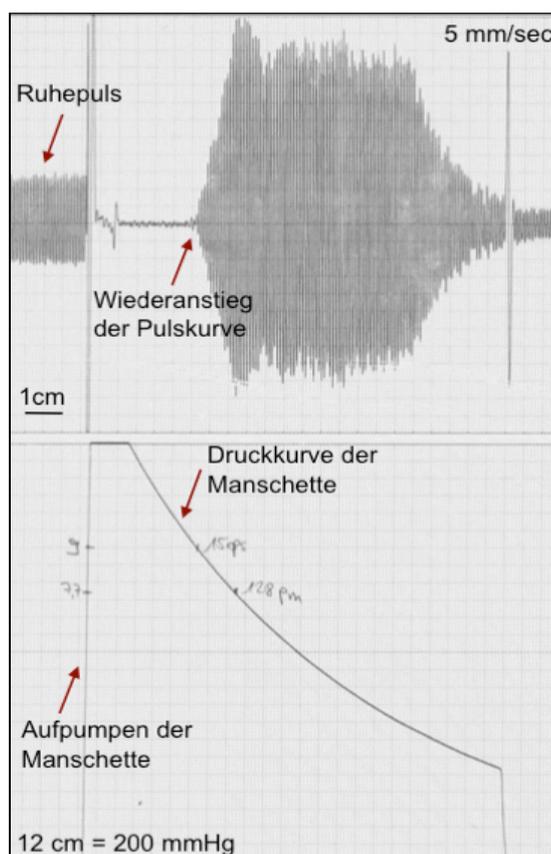


Abbildung 11: Auswertung des systolischen Blutdrucks. Repräsentative Darstellung der Pulskurve (oben) und Druckkurve der Manschette (unten). Nach Aufpumpen der Schwanzmanschette verschwindet der Ruhepuls (oben). Der in der Druckkurve erhaltene Wert zum Zeitpunkt des Wiederanstiegs der Pulskurve entspricht dem systolischen Blutdruck.

3.2.7 Elektrolyt- und Creatininbestimmung

28 Tage nach Pumpenimplantation wurden die Tiere erneut mit Ketamin/Xylazin narkotisiert. Nach Eröffnung des Thorax konnte circa 300 µl Blut direkt aus der Vena cava inferior entnommen und in Lithium-Heparin-Plasmaröhrchen überführt werden. Nach der Zentrifugation bei 2000 x g (10 min) und 20°C konnte der Überstand abgenommen und daraus die Elektrolyte (Na⁺, K⁺, Cl⁻) sowie Creatinin bestimmt werden. Dies erfolgte freundlicherweise durch das Institut für Klinische Chemie (Zentral-Labor des Klinikums der Universität zu Köln).

3.2.8 Elektrokardiogramm (EKG)

Einigen Ratten (n=3 pro Gruppe) wurde zusätzlich zu der osmotischen Pumpe an Tag 0 ein Telemetriesender (TA10ETA-F20, DSI[®]) implantiert (Abbildung 12). Dadurch konnten Langzeit-EKG's am wachen und frei beweglichen Tier aufgezeichnet werden. Ein Telemetriesender setzt sich aus einer Sendereinheit, einer Batterie, die mittels eines Magneten aktiviert werden kann, und 2 Ableitelektroden zusammen (Abbildung 12 links). Dieser wurde subkutan mit einer Eindhoven II-Ableitung in das Tier gebracht (Abbildung 12 unten). Dazu wurden die Ratten präoperativ gewogen, um die exakte Narkosemenge festzulegen. Die Narkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion in den Unterbauchbereich mit 50 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 7 mg/kg Körpergewicht Xylazin. Die Ratten wurden an den entsprechenden Eingriffsorten enthaart, desinfiziert und auf eine sterile Unterlage auf eine Wärmeplatte (37-38°C) überführt. Der Hautschnitt erfolgte an der rechten Flanke (Regio abdominalis lateralis dexter). Dort wurde mittels einer stumpfen Sonde eine subkutane Tasche ausgebildet, in die der Transmitter eingeführt wurde. Die beiden Ableitelektroden wurden durch Tunnelung der Haut und mit Hilfe eines Plastikröhrchens als Führungsrinne subkutan zum rechten Vorderbein (negative Elektrode) sowie in die Nähe des Xiphoids (Processus xiphoideus sterni) (positive Elektrode) nahe der Herzspitze geführt. Dort erfolgte jeweils eine kleine Inzision, um die Enden der Ableitungen am Muskel mit einem nicht-resorbierbaren Polyamidfaden (Ethicon[®], 3-0) zu fixieren. Zuvor war es notwendig, die Enden der Elektroden abzuisolieren, damit ein Kontakt zum Gewebe entstehen konnte. Die Ableitungsenden wurden vor der Fixierung mit einer Kunststoffkappe verschlossen, um Störsignale zu vermindern. Die Inzisionen wurden schließlich mit Wundklammern verschlossen. Unmittelbar nach der Implantation wurden die Funktion des Senders sowie die Ableitung überprüft. Alle Ratten erhielten nach OP 2-3 Tage Carprofen (4 mg pro kg Körpergewicht) zur Schmerztherapie. Die Aufzeichnung des EKG's erfolgte drei und vier Wochen nach Implantation für jeweils 24 Stunden. Der implantierte Transmitter sendet dabei

ein Analogsignal an den Empfänger (Receiver-Platte, RPC-1), der dieses über einen Multiplexer (Data Exchange Matrix) an eine Analyseeinheit (Data Acquisition and Analysis, DSI[®]) weiterleitet (Abbildung 12 rechts). Es können eingehende Signale von bis zu sechs Tieren simultan aufgezeichnet werden. Die Auswertung der EKG Daten wurde mit einem Analyseprogramm (Dataquest A.R.T. Analysis Program, Version 4.1, DSI[®]) durchgeführt. Das Auftreten von Veränderungen im EKG wurde für jedes Tier quantifiziert.

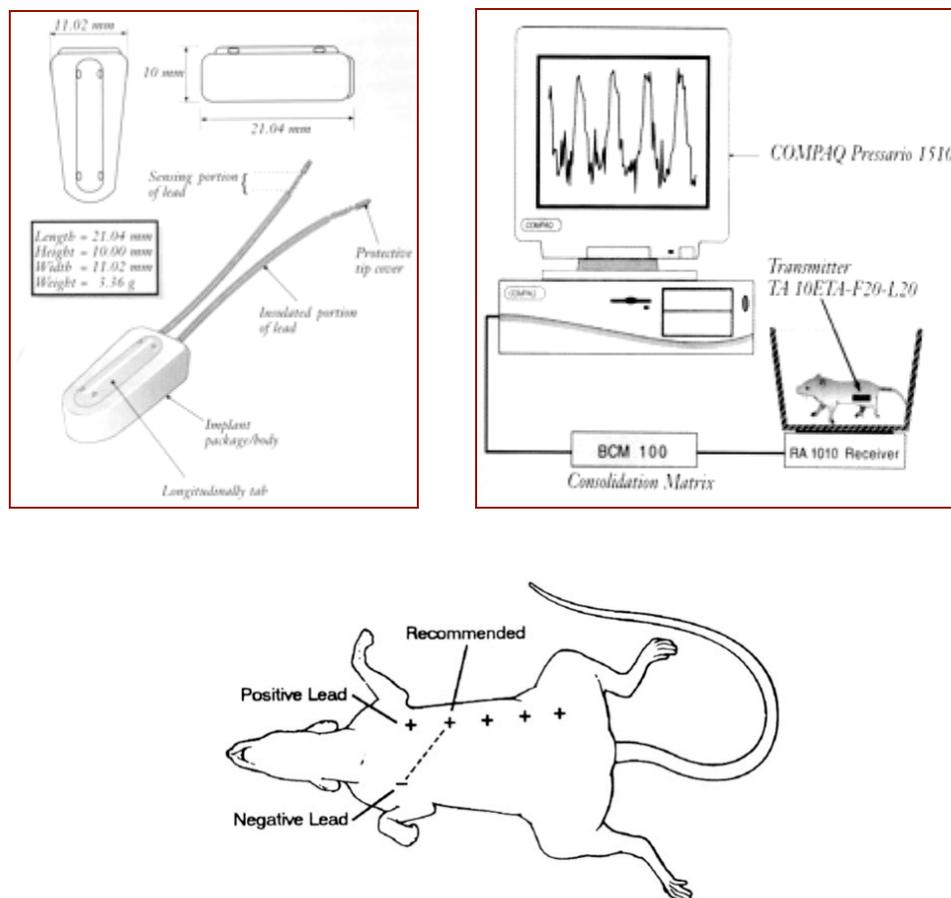


Abbildung 12: EKG-Aufzeichnung

Aufbau des Telemetriersenders (oben links) und Aufzeichnung des EKG über Receiverplatte und Multiplexer (oben rechts) (aus Klaas Kramer: „*Applications and Evaluation of Radio-Telemetry in Small Laboratory Animals*“, Universität Utrecht, 1998). Im unteren Bild ist die Position der Ableitelektroden (*positive lead*, *negative lead*) für die Eindhoven-II-Ableitung abgebildet (DSI[®]).

3.2.9 Magnetokardiogramm (MKG)

Die Aufzeichnung des MKG's erfolgte an einer Sieben-Kanal-Magnet-Messanlage für Kleintiere und wurde freundlicherweise mit Hilfe von Herrn Dr. Robert Fischer und Herrn Andreas Gapelyuk an der Franz-Volhard-Klinik in Berlin-Buch (Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin) durchgeführt. Die Messvorrichtung bestand aus sieben Induktionselementen, den sogenannten SQUIDs (*Superconducting Quantum Interference Devices*). Diese Detektoren werden durch Helium auf eine Temperatur von -269°C gekühlt und befinden sich in einem abgeschirmten Messraum, in dem zusätzlich das Kontroll-EKG der Tiere aufgezeichnet werden konnte. Zusätzlich kam ein Kleintiertisch zum Einsatz, der eine reproduzierbare exakte Ausrichtung des Tieres für die Aufzeichnung des kardialen Magnetfeldes ermöglichte (Abbildung 13). Durch Verschieben des Tieres auf einer beweglichen Platte auf dem Kleintiertisch konnte das Magnetfeld, das sich senkrecht zum Thorax ausbreitet, an vier Positionen bestimmt werden, so dass ein 28-Punkte-Messgitter resultierte (7 SQUIDS). Die an den 28 Positionen gemessenen MKG-Kurven wurden über Interpolation in ein standardisiertes 6×6 Punkte-Gitter transformiert (Abbildung 14). Die Abtastrate lag bei 1000 Hz. Für die Messung wurde das Tier mit 2% Isofluran narkotisiert. Die aufgezeichneten Mappen starteten mit der Q-Zacke und endeten nach der T-Welle. Das Magnetfeld von sechs Tieren aus jeder Gruppe (CON, ALD, SPI, ALD+SPI, EPL, ALD+EPL) wurde nach vierwöchiger Versuchsdauer bestimmt.

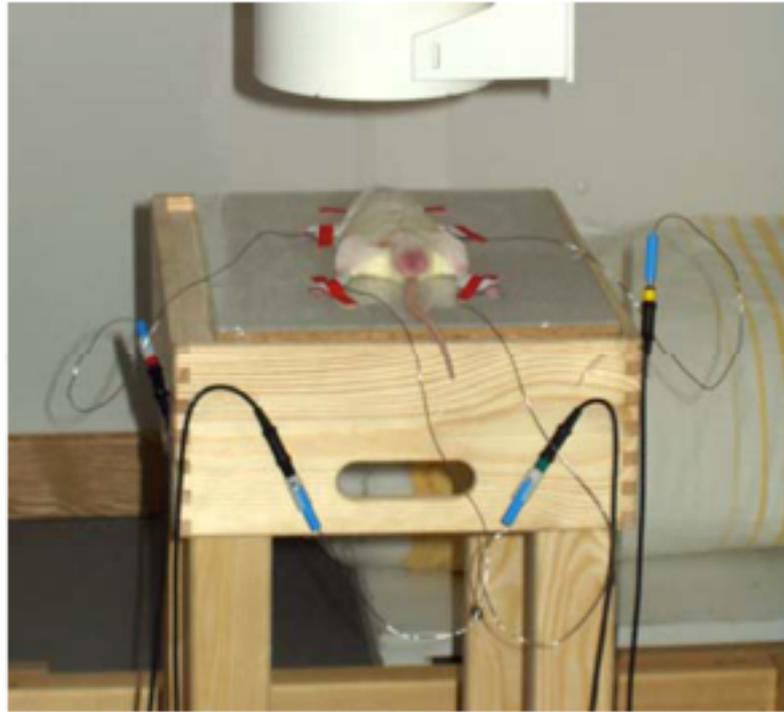


Abbildung 13: Position eines Tieres während der Aufzeichnung des kardialen Magnetfeldes

Das Tier wird nach Isofluran-Narkose zentriert auf einer beweglichen Platte fixiert. Oberhalb des Tieres befinden sich die für die Aufzeichnung des MKG benötigten SQUIDS in Helium gekühlt. Zusätzlich wird durch Anbringung von Elektroden das EKG während der Messung überwacht (Foto: Robert Fischer).

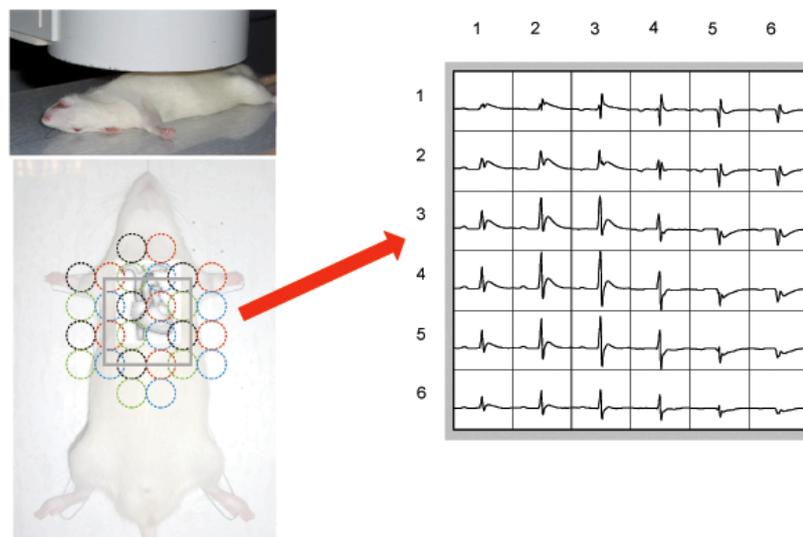


Abbildung 14: MKG Aufzeichnung

Aus der Messung des kardialen Magnetfeldes an 4 Positionen (siehe schwarze, grüne, rote und blaue Kreise) resultiert ein 28-Punkte-Messgitter (7 SQUIDS). Die an den 28 Positionen gemessenen MKG-Kurven werden über Interpolation in ein standardisiertes 6x6 Punkte-Gitter transformiert (rechts).

In Abbildung 15 ist eine EKG-Spur zusammen mit einem MKG dargestellt. Das magnetische Feld des Herzens korreliert dabei exakt mit der elektrophysiologischen Erregungsausbreitung im Herzen. Durch das MKG ist eine genauere Darstellung der Erregung möglich, da das dem Herzen umliegende Gewebe im Gegensatz zu der EKG-Aufzeichnung keine Störungen während der Messung verursacht. Ein weiterer Unterschied ist die Ausbreitungsrichtung der Signale, der Hauptvektor verläuft im EKG vor allem radial, im MKG dagegen primär tangential.

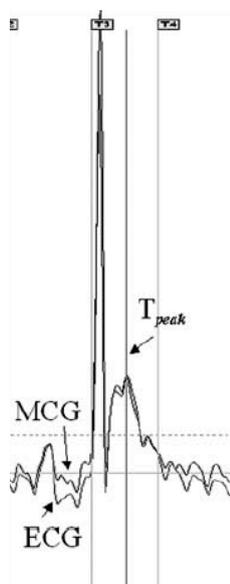


Abbildung 15: Unterschied MKG und EKG (Brisinda et al. 2004)

Überlagerung der MKG- und EKG-Spuren zeigt, dass das magnetische Feld des Herzens exakt mit der elektrophysiologischen Erregungsausbreitung korreliert.

3.2.10 RNA Extraktion und Umschreiben in cDNA

Nach vierwöchigem Versuchsablauf wurden die Herzen unter Ketamin/Xylazin Narkose entnommen, in eiskalter 0,9%iger Kochsalzlösung gewogen, und nach Aufteilung in Vorhöfe, linken und rechten Ventrikel in einer Wollenbergklemme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die RNA-Extraktion wurde ein Teil des linken Ventrikels in flüssigem Stickstoff mit einem Metallstößel zerkleinert und mit 1ml peq-Gold RNA Pure™ versetzt. Auf Eis erfolgte die weitere Zerkleinerung der Proben mit einem elektrischen Homogenisator (Ultra-Turrax). Anschließend wurden die Proben 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und schließlich mit 0,2 ml Chloroform versetzt und 15 sec kräftig geschüttelt. Nach einer

Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben 5 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen aus, wobei die obere wässrige RNA-haltige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit der gleichen Menge Isopropanol versetzt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden die Proben erneut 10 min nach den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Es bildete sich ein gelartiges RNA- Präzipitat am Boden des Gefäßes und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit 75%igem Ethanol gewaschen und zwischen jedem Waschschrift 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Das an der Luft getrocknete Pellet wurde schließlich in 30 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration der Proben erfolgte an einem Spektrophotometer (Nanodrop ND-1000) (Dreifachbestimmung). Der Nullabgleich wurde dabei mit Aqua dest. durchgeführt und der Blank-Wert mit DEPC-H₂O bestimmt. Der Quotient E_{260}/E_{280} , der ein Maß für die Reinheit der RNA-Probe darstellt, lag bei allen Messungen zwischen 1,7 und 2,0, andernfalls wurde die Messung wiederholt.

Ein Volumen, das 1 µg RNA enthielt, wurde für das Umschreiben der RNA zur cDNA verwendet (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit). Die Proben wurden mit 1 µl Random-Primer versetzt und bei 10.000 U/min anzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Inkubation 5 min bei 70°C im Wasserbad. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben daraufhin 5 min auf Eis gelagert. Nach erneutem Anzentrifugieren wurden 7 µl Mastermix (4 µl Reaction buffer, 2 µl dNTP-Mix 10 mM und 1 µl RNase-Inhibitor 20 U/µl) zu jeder Probe gegeben. Die Reaktionsansätze wurden 5 min bei 25°C inkubiert, anschließend anzentrifugiert und mit 1 µl MMuLV-Reverse Transkriptase versetzt. Es erfolgte eine Inkubationsreihe bei 25°C (10 min) und 42°C (60 min). Bei 70°C (10 min) wurde die Reaktion schließlich gestoppt. Es resultierte ein Endvolumen von 28 µl, das mit RNase freiem H₂O auf 100 µl verdünnt wurde. Die Proben wurden zur längerfristigen Aufbewahrung bei -80°C gelagert.

3.2.11 Realtime-PCR

5 µl cDNA (50 ng) jeder Probe wurde für die Durchführung der Realtime-PCR (7300 Real-Time PCR System) (Abbildung 16) eingesetzt und mit 2,5 µl des jeweiligen Taqman Gene Expression Assays sowie 25 µl TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems) versetzt und mit RNase freiem H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl verdünnt. Für das PCR-Gerät wurden ABI PRISM[®] 96-Well Optical Reaction Plates (Applied Biosystems) verwendet. Jede Probe wurde doppelt bestimmt. Die erhaltenen „*cycle threshold*“ (Ct) Werte wurden auf eine endogene Kontrolle (β2-Microglobulin) normalisiert, die auf derselben Platte gemessen wurde. Die Unterschiede in der mRNA Konzentration wurden für jede Probe relativ zur Kontrollgruppe kalkuliert, indem die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak and Schmittgen 2001) Verwendung fand. Die Bedingungen für die Durchführung der RT-PCR waren: 10 min 95°C, 40 Zyklen mit einer Dauer von 15 Sekunden bei 95°C und einer Minute bei 60°C.

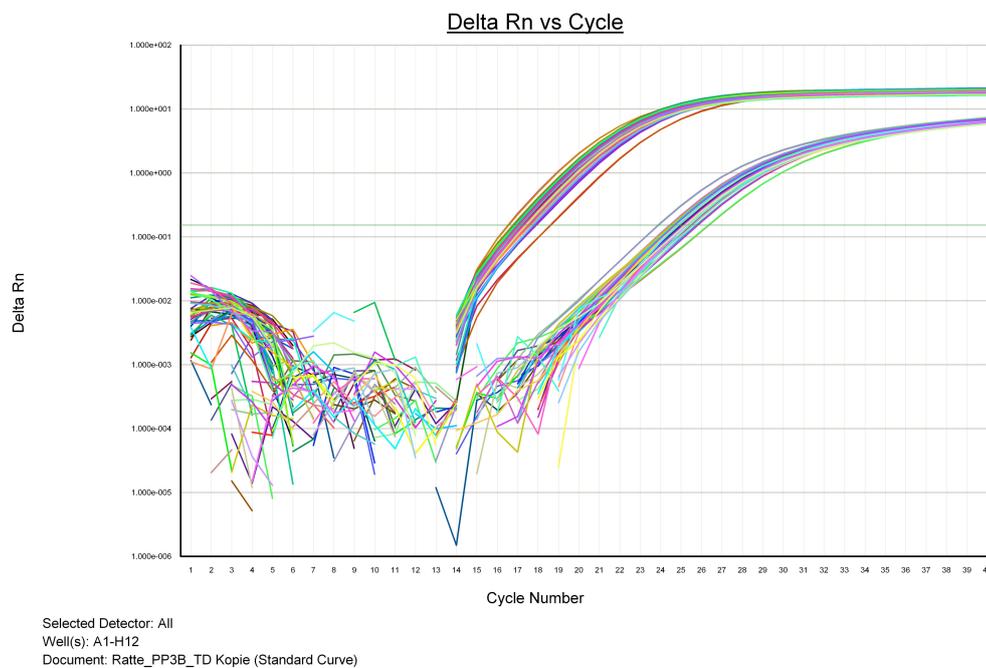


Abbildung 16: Repräsentativer RT-PCR-Lauf mit dem zu untersuchenden Zielgen (hier: Calcineurin Aβ = PPP3CB) zusammen mit der endogenen Kontrolle (β2-Microglobulin = β2m). Die erhaltenen cycle threshold (Ct) Werte wurden auf β2m normalisiert und die Auswertung erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak and Schmittgen 2001).

Für jedes TaqMan[®] Gene Expression Assay war es notwendig, vor dem eigentlichen RT-PCR-Lauf ein Validierungsexperiment durchzuführen, um zu überprüfen, ob das ausgewählte „house-keeping“ Gen (β 2-Microglobulin) zusammen mit den verwendeten Gene Expression Assays eingesetzt werden kann. Dabei sollten die ΔC_T -Werte konstant sein und sich nicht in Abhängigkeit von der eingesetzten cDNA Menge ändern, was sich in den ermittelten Steigungen der Gene Expression Assay-Verdünnungsreihen zeigte (Soll: Steigung zwischen -3,3 und -3,4). Andernfalls ist ein Bezug auf das „house-keeping“ Gen nicht möglich. Für die Durchführung wurden Serien mit fünf Verdünnungen einer cDNA Probe für jedes Gene Expression Assay angefertigt. Jedes Zielgen wurde zusammen mit der endogenen Kontrolle (β 2m) aufgezeichnet. Die eingesetzte cDNA Menge wurde logarithmisch gegen ΔC_T aufgetragen und anhand der erhaltenen Gerade die Steigung bestimmt (Abbildung 17). Diese lag für alle Zielgene in dem vorgegebenen Bereich, so dass die komparative $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode der Datenanalyse für die relative Quantifizierung eingesetzt werden konnte.

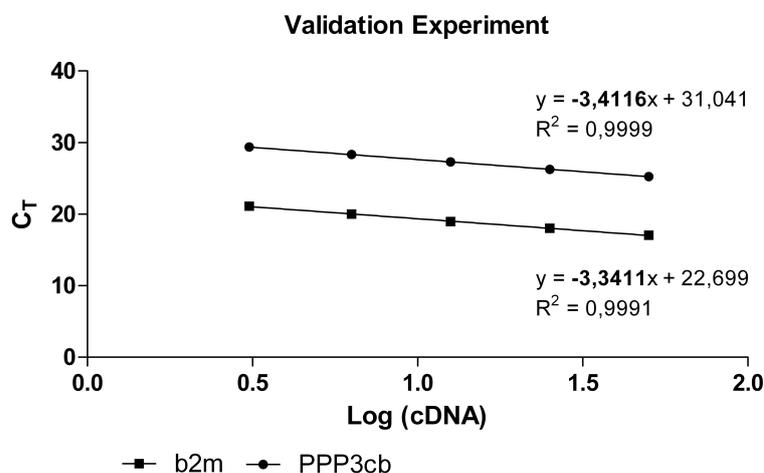


Abbildung 17: Repräsentative Auswertung des Validierungsexperiments für Calcineurin A β (PPP3CB) *Gene Expression Assay* und β 2m. Die eingesetzte cDNA Menge wurde logarithmisch gegen ΔC_T aufgetragen und die Steigungen bestimmt. Hier lagen die Steigungen zwischen -3,3 und -3,4 mit konstanten ΔC_T -Werten, die sich nicht abhängig von der eingesetzten cDNA Menge ändern, so dass der Bezug auf die endogene Kontrolle möglich war.

3.2.12 Western Blot

Für die Western Blot Experimente wurde das Gesamtprotein aus linksventrikulärem Gewebe isoliert (n=8 pro Gruppe). Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert, gewogen, mit der zehnfachen Menge Präparationspuffer versetzt und mit einem elektrischen Homogenisator (Ultra-Turrax) und Ultraschall bei 4°C weiter behandelt. Nach Zugabe der gleichen Menge Gefrierpuffer wurde das Homogenisieren wiederholt. Daraufhin erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford. Eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) in einer Konzentrationsreihe von 1000 µg/ml bis 62,5 µg/ml wurde zusammen mit den Proben (10 µl einer 1:10 Verdünnung, Dreifachbestimmung) und dem Blank-Wert (10 µl Aqua dest.) auf eine 96-well-Platte pipettiert. Nach Zugabe von 140 µl Bradfordreagenz und einer Reaktionszeit von fünf Minuten wurde die Extinktion (ELISA-Reader) bei 570 nm gemessen, die sich direkt proportional zu der Proteinkonzentration verhält. Anhand der erhaltenen BSA-Standardkurve (Konzentration in µg/ml zur Extinktion) konnte so die Konzentration der Proteinproben bestimmt werden.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE). Es handelt sich hierbei um ein diskontinuierliches Verfahren mit einem Sammelgel und einem Trenngel. Dazu werden zwei Glasplatten nach gründlicher Reinigung mit Ethanol mit zwei Abstandhaltern (*Spacer*) in einer Halterung fixiert. Die Auswahl der Konzentrationen des Sammel- und Trenngels erfolgte anhand des zu detektierenden Molekulargewichtes der Proteine, so dass in dieser Arbeit ein 10% Trenngel und ein 4% Sammelgel verwendet wurde. Das Trenngel wurde zwischen die Glasplatten pipettiert und mit einer 0,1 %igen SDS-Lösung überschichtet, um das Austrocknen zu verhindern. Nach einer Polymerisationszeit von einer Stunde konnte das überschüssige SDS entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet werden. Ein 15er Kamm wurde eingebracht, der die Probenaschen ausformte. Nach einer weiteren Polymerisationszeit von 30 min wurde der Kamm entfernt und die Probenaschen mit 1x

Laufpuffer gespült, um Polyacrylamidreste und andere Verunreinigungen auszuschließen, die die Auftrennung der Proteine beeinflussen. In der Zwischenzeit konnten die Proteinproben für die Elektrophorese vorbereitet werden. Dazu wurden die Proben auf Eis aufgetaut, und die Volumina, die 75 µg Protein enthielten, wurden in 0,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Vorher wurden alle Proteinproben mit Aqua dest. auf das gleiche Volumen eingestellt. Dieses entsprach dem Volumen des Probenpuffers, das zu jeder Probe hinzugegeben wurde. Die Denaturierung der Proteinproben erfolgte fünf Minuten bei 95°C. Nach Einbringen der Proben und eines Proteinmarkers in die Taschen des Sammelgels wurde die Elektrophorese mit vorgekühltem Elektrophoresepuffer und unter Kühlung der Elektrophoresekammer gestartet. Bei einer angelegten Spannung von 80 V - 100 V sammelten sich die Proteine nach circa einer Stunde an der Grenzfläche des Trenngels und wurden anschließend bei 180 V in circa vier bis fünf Stunden aufgetrennt. Auf jedes Sammelgel wurde zusätzlich eine Proteinprobe aus Rattenhirn aufgetragen, die eine Positivkontrolle für den eingesetzten Antikörper darstellte.

Zum Transferieren (Blotten) der Proteine wurde eine Nitrocellulosemembran (0,2 µm) auf Gelgröße zugeschnitten und 10 min in dem methanolhaltigen Blotpuffer äquilibriert. In einer Blot-Kassette wurde das sogenannte Blotting-Sandwich für den Blotvorgang vorbereitet. Dazu wurden ein Schaumstoff-Schwamm und eine Lage Whatman-Papier von zwei Seiten eingelegt. Auf das Whatman-Papier wurde die Nitrocellulosemembran gebracht und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Das Blotting-Sandwich wurde in der Blotkammer fixiert und der Protein-Transfer konnte 16 Stunden bei 65 mA und 4°C gestartet werden.

Die Überprüfung des Protein-Transfers auf die Membran erfolgte mit einer Ponceau-S-Färbung (Inkubation 10 min). Um die nicht besetzten Areale auf der Membran zu blockieren, damit eine spätere unspezifische Bindung der Antikörper an diesen Stellen verhindert wird, wurde die Membran eine Stunde in 5% Magermilchpulver bzw. 5% BSA in PBST bzw. TBST blockiert (siehe Tabelle unten). Die Milchpulver enthaltende Blockierlösung wurde vor

Gebrauch filtriert, dadurch konnte verhindert werden, dass es bei der Entwicklung zu Verunreinigungen auf dem Film kam. Anschließend erfolgten drei Waschschrirte für je 10 min, bevor die Membran über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert wurde. Die Primärantikörper wurden wie folgt verdünnt:

| <u>Antikörper</u> | <u>Verdünnung</u> | <u>Blockierung</u> |
|--------------------------|------------------------|--------------------|
| Anti-GAPDH | 1:6000 in TBST | 5% BSA/TBST |
| Anti-Kir2.1 | 1:200 in 5% Milch/PBST | 5% Milch/PBST |
| Anti-Kir2.3 | 1:200 in TBST | 5% Milch/TBST |
| Anti-Kv4.2 | 1:200 in 5% Milch/PBST | 5% Milch/PBST |
| Anti-Kv4.3 | 1:200 in 5% Milch/PBST | 5% Milch/PBST |
| Anti-Kv1.5 | 1:100 in 5% Milch/PBST | 5% Milch/PBST |
| Anti-Ca _v 1.2 | 1:200 in 5% Milch/PBST | 5% Milch/PBST |

Nach sechs Waschschrirten für je 10 min mit PBST/ TBST wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate) 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf weiteren Waschschrirten (je 4x10 min mit PBST/ TBST und 1x10 min mit PBS/ TBS) konnten die Proteine mithilfe des ECL Detektionssystems (Lumi-Light Western Blotting Substrate) detektiert werden. Beide Detektionsreagenzien wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und eine Minute auf die Membranen gegeben. Die Belichtung der Filme (Curix, AGFA) erfolgte dabei meist nach einer Minute, fünf Minuten und 10 min. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente in diesem Versuch als Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung der Gele, da unter den experimentellen Bedingungen keine veränderte Proteinexpression des GAPDH zu erwarten war.

Da die verwendeten Antikörper nur polyklonal verfügbar waren, kam es zur unspezifischen Bindung an verschiedene Proteine auf der Membran. Dadurch war es notwendig, in einem Vorversuch die entsprechende Proteinhöhe für das nachzuweisende Protein zu detektieren. Dazu wurde ein spezifisches Kontroll-Antigen für jeden Antikörper als Negativkontrolle

verwendet. Der entsprechende Antikörper wurde in 500 µl PBS gelöst, das 1% BSA und 0,025 % Natriumazid enthielt und in einem weiteren Ansatz wurde das für den Antikörper vorgesehene Kontroll-Antigen hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die Lösungen fünf Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand konnte für die Durchführung des Western-Blots verwendet werden. Durch die Zentrifugation wurden eventuell ausgebildete Aggregate aus der Lösung entfernt. Der Überstand wurde mit 4,5 ml 5 %iger Milch in PBS versetzt und mit dieser Antikörperlösung wurden die Membranen eine Stunde inkubiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem oben genannten Protokoll. In Abbildung 18 ist die Auswertung der Bandenhöhe für jeden verwendeten Antikörper dargestellt. Die entsprechende Proteinbande konnte durch Zugabe des Antigens auf dem Blot blockiert werden, so dass nach der Entwicklung keine bzw. eine abgeschwächte Bande detektiert wurde. Bei dem Vorversuch mit Anti-Kv4.3 blockierte das Antigen mehrere Banden (siehe auch Abbildung 18), so dass wir uns zusätzlich auf die in der Literatur angegebene Proteingröße von Kv4.3 bezogen, die in Abbildung 18 markiert ist. Für Anti-Kv1.5 wurden zwei Proteinbanden detektiert (nicht abgebildet), die sich aber in der Intensität parallel verhielten, so dass nur eine Bande für die Auswertung verwendet wurde (Yamashita et al. 2000).

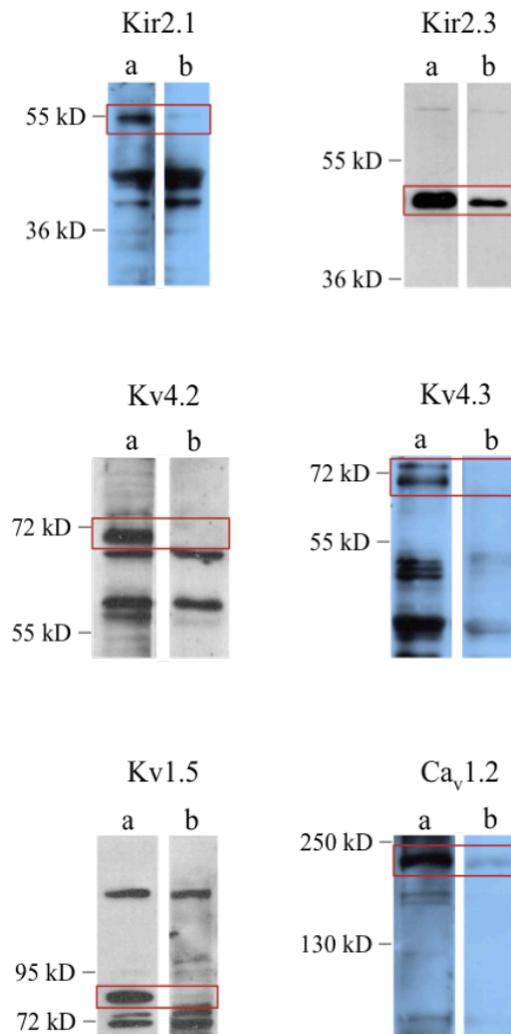


Abbildung 18: Antikörpertest, Bandenhöhe der polyklonalen Antikörper

Die verschiedenen Antikörper wurden ohne Antigen (a) und mit Antigen (b) inkubiert. Das entsprechende Antigen blockiert die Zielbande, so dass eine Aussage zu der Höhe der zu untersuchenden Proteine möglich ist. Resultierende Bandenhöhen für jedes Protein: Kir2.1 = 55 kD; Kir2.3 = 50 kD; Kv4.2 = 70 kD; Kv4.3 = 72 kD; Kv1.5 = 82 kD; Ca_v1.2 = 210 kD

3.2.13 Elektronenmikroskopie

Um die strukturellen Veränderungen des Myokards zu untersuchen, wurden 9 männliche Wistar Ratten (Charles River, mittleres Gewicht 276±8 g) mit einer osmotischen Minipumpe versehen (siehe dazu Kapitel 3.2.3). Drei dieser Tiere erhielten dabei eine Pumpe, die PEG-400 freisetzt und eine Kontrolldiät (CON, n=3). Die übrigen Tiere wurden jeweils mit einer Pumpe ausgestattet, die Aldosteron (1 µg/h) freisetzt. Die Hälfte dieser Tiere bekam ebenfalls eine Kontrolldiät (ALD, n=3), die übrigen Ratten erhielten mit Spironolacton

versetztes Futter (ALD+SPI, n=3). Nach 28 Tagen wurden die Tiere mit 3-Pentanol/Tribromethanol (1 ml/kg) narkotisiert und das Herz nach Thorakotomie retrograd über die Aorta ascendens bei einem Perfusionsdruck von 90 mmHg perfusionsfixiert. Die Fixationslösung setzte sich aus einer 2,5%igen Glutardialdehydlösung, 0,1 M Cacodylatpuffer und 0,2% gesättigter Pikrinsäure (pH 7,3) zusammen. Die linken Ventrikel wurden in der Fixationslösung bis zur Einbettung bei 4°C gelagert. Die Präparate wurden nach mehrmaligem Waschen mit 0,1 M Cacodylatpuffer in 2%ige Osmiumsäure überführt und zwei Stunden nachfixiert. Nach weiteren Waschschritten in Cacodylatpuffer erfolgte die Blockkontrastierung mit Uranylacetat (1% in 70%igem Ethanol). Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Propylenoxid als Zwischenmedium überführt und in Epon eingebettet. Nach Aushärtung der Eponblöcke konnten an einem Ultramikrotom Semidünnschnitte (Schnittdicke 1 µm) angefertigt werden, die nach Färbung mit Methyleneblau (modifiziert nach Richardson) lichtmikroskopisch mit einem Photomikroskop (Leica) sowie einem Zeichenmikroskop untersucht wurden. Mit einer Dicke von 40-50 nm wurden Schnitte am Ultramikrotom erstellt, mit Bleicitrat nachkontrastiert und unter dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

3.2.14 Aktivitätsbestimmung von Calcineurin

Die Calcineurinaktivitätsbestimmung (PP2B) erfolgte kolorimetrisch mit dem *Calcineurin Assay Kit* (Enzo Life Sciences International, Inc.). Für die Präparation des Gewebeextraktes wurde linksventrikuläres Gewebe (n=4 aus jeder Tiergruppe) gewogen und mit der entsprechenden Menge Lysepuffer versetzt (0,5 ml pro g Gewebe). Der Lysepuffer wurde vor Gebrauch mit einem Proteaseinhibitor versetzt, um die Zersetzung der Proteine zu verhindern. Die Lösung wurde durch eine 20G Nadel gegeben und anschließend drei Minuten bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinproben wurden bei -80°C gelagert. Um die Proben phosphat- und nukleotidfrei zu bekommen, wurde Harz für die Chromatographiesäule mit 20 ml Aqua dest. übergossen und über Nacht bei 4°C

rehydriert. Das Wasser wurde abdekantiert und das Harz im Verhältnis 1:1 mit frischem Aqua dest. aufgefüllt (10 ml). Das rehydrierte Harz konnte anschließend in die Chromatographiesäule überführt werden. Zum Äquilibrieren kamen 8 ml Lysispuffer in die Säule und das Eluat wurde verworfen. Die Säule wurde drei Minuten bei 800g und 4°C zentrifugiert und anschließend mit der zu dephosphorylierenden Proteinprobe (350 µl) versetzt und erneut bei oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Eluat entsprach der dephosphorylierten Proteinprobe und die Konzentration konnte nach Bradford bestimmt werden. Zur Überprüfung der vollständigen Dephosphorylierung wurde jeweils 1 µl der Proteinproben mit 100 µl Biomol Green™ Reagenz versetzt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Negativkontrolle (1 µl Aqua dest. + 100 µl Biomol Green™ Reagenz) verglichen. Die Färbung der Proben sollte sich im Vergleich zu der Negativkontrolle nicht verändern, andernfalls wurde die Dephosphorylierung der Proteine wiederholt. Die für die Calcineurin Aktivitätsbestimmung eingesetzte Konzentration der Proben lag bei 1 µg/µl. Eine Phosphatstandardkurve wurde erstellt mit Konzentrationen von 40 µM bis 0,625 µM, was einer freigesetzten Phosphatmenge zwischen 2 nmol und 0,031 nmol entsprach. Ebenso wurde der Background-Wert bestimmt, der eventuell vorhandenes Phosphat sowie andere Störfaktoren beinhaltet und von den eigentlichen gemessenen Werten abgezogen wurde. Die totale Phosphatase-Aktivität in dem Gewebeextrakt wurde unter Zugabe von Calmodulin bestimmt. Zusätzlich wurde die Aktivität von Calcineurin (PP2B) unter Zugabe von EGTA blockiert, das freie Ca²⁺-Ionen bindet, die für die Aktivität von Calcineurin erforderlich sind. Die Aktivität aller anderen aktiven Phosphatasen (Proteinphosphatase 1 (PP1) und Proteinphosphatase 2 (PP2A)) wurde somit bestimmt. Als Positivkontrolle diente humanes rekombinantes Calcineurin-Enzym. Als Substrat diente für alle Parameter (außer für die Backgroundbestimmung und die Standardkurve) RII Phosphopeptid mit folgender Sequenz: Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu. Alle genannten zu ermittelnden Parameter wurden für jede

Gewebeprobe doppelt bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 30°C wurde zu jeder Probe 100 µl Biomol Green™ Reagenz pipettiert und nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min konnte die Extinktion bei 620 nm gemessen werden. Anhand der Standardkurve konnte die Menge des freigesetzten Phosphates (nmol) bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte nach folgender Berechnung:

$$\text{Calcineurin (PP2B)} = \text{Total}_{\text{Background}} - \text{EGTA}_{\text{Background}}$$

4. Ergebnisse

4.1 Kardiale Hypertrophie

Chronische Aldosteronexposition führt in männlichen Wistar-Ratten zu der Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie. Dieses Ergebnis wurde durch verschiedene Parameter, die im Folgenden genannt werden, belegt. Das relative Herzgewicht wurde ermittelt, indem das Naßgewicht des Herzens nach direkter Entnahme gewogen und in das Verhältnis zu der Tibiallänge gesetzt wurde. Die Tibiallänge wurde verwendet, da diese eine konstante Größe im Tier darstellt im Gegensatz zu dem Körpergewicht, das bei den Aldosterontieren nach Versuchsende im Vergleich zu den anderen Gruppen leicht erhöht war. In diesem Versuch zeigten die Aldosteron behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren ein signifikant erhöhtes absolutes und relatives Herzgewicht (Tabelle 3). Die beiden Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon konnten diesen Effekt verhindern und die Tiere entwickelten mit der Kontrollgruppe vergleichbare Herzgewichte.

| Parameter | CON | ALD | SPI | ALD+SPI | EPL | ALD+EPL |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|----------------|------------|----------------|
| Körpergewicht (g) (Tag 0) | 201,7±6,3 | 215,1±7,9 | 207,8±3,4 | 213,8±4,6 | 211,0±8,5 | 213,1±6,6 |
| Körpergewicht (g) (Tag 28) | 374,6±8,4 | 396,7±7,6 | 377,1±6,9 | 366,8±7,7 | 371,4±8,3 | 367,1±9,6 |
| Tibiallänge (mm) (TL) | 42,7±2,5 | 39,9±0,8 | 41,2±1,9 | 45,6±2,2 | 41,8±0,9 | 42,4±2,9 |
| Herzgewicht (g) (HG) | 1,28±0,11 | 1,52±0,06* | 1,24±0,09 | 1,26±0,09 | 1,34±0,11 | 1,19±0,21 |
| HG/ TL (mg/mm) | 30,8±1,3 | 38,1±0,9* | 30,3±1,2 | 28,1±2,0 | 32,0±1,4 | 28,7±2,8 |

Tabelle 3: Parameter aller Gruppen nach vier Wochen

Das Körpergewicht an Tag 0 und an Tag 28 ist nicht verändert, es kommt lediglich in ALD an Tag 28 zu einer tendenziellen Zunahme des Körpergewichtes, so dass für die Erhebung des relativen Herzgewichtes die Tibiallänge der Tiere hinzugezogen wurde. Sowohl das absolute als auch das relative Herzgewicht der Ratten ist in ALD signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen Tiergruppen. Die Tiere, die Aldosteronantagonisten erhielten, entwickelten Herzgewichte auf Kontrollniveau.*P<0,05 gegenüber CON, alle n=8; TL und HG/TL n=5

4.2 ANP

Die relative Genexpression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) stellt einen Marker für das Auftreten einer kardialen Hypertrophie dar und wurde bei den Versuchstieren nach vier Wochen im linken Ventrikel bestimmt. In Abbildung 20 zeigen die Aldosterontiere (ALD) eine circa dreifach erhöhte mRNA Expression von ANP im Vergleich zu den Kontrolltieren (ALD $2,9 \pm 0,4$ -fach). Eplerenon konnte die Aldosteron-induzierte Zunahme der ANP mRNA Expression signifikant verhindern ($0,8 \pm 0,1$ -fach, $P < 0,01$ gegenüber ALD) im Gegensatz zu Spironolacton (ALD+SPI $2,9 \pm 0,7$ -fach gegenüber CON). Die Aldosteronantagonisten allein (SPI, EPL) haben keinen Effekt auf die ANP mRNA-Expression.

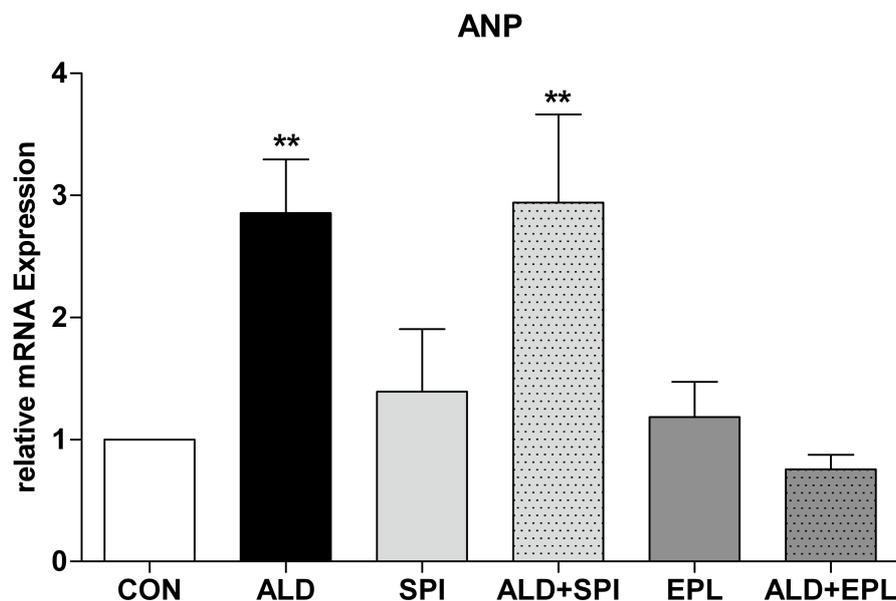


Abbildung 20: Relative mRNA Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP)

Die relative Genexpression von ANP in linksventrikulärem Gewebe der Tiere ist nach vier Wochen durch Aldosteron signifikant erhöht. Spironolacton kann im Gegensatz zu Eplerenon den aldosteron-induzierten Anstieg der ANP mRNA Expression nicht verhindern. Die Aldosteronantagonisten allein (SPI, EPL) haben keinen Effekt auf die mRNA Expression von ANP. ** $P < 0,01$ gegenüber CON, $n=8$ pro Bedingung

4.3 Systolischer Blutdruck

Der systolische Blutdruck wurde an Tag 0 und an Tag 28 nach Aldosteronstimulation bestimmt, um eine erhöhte Nachlast am Herzen auszuschließen, die ebenfalls zu der Induktion einer Hypertrophie führt. Die Blutdruckwerte zeigten keine Veränderungen während des

Versuchszeitraums und in den einzelnen Tiergruppen (Abbildung 19). Die Stresskomponente während der Messung wurde minimiert, indem die Tiere zuvor für mindestens 15 min an die Situation gewöhnt wurden, bevor die Messung gestartet wurde. Zusätzlich wurden so viele Messungen pro Tier durchgeführt, bis drei gleichmäßige Blutdruckkurven resultierten.

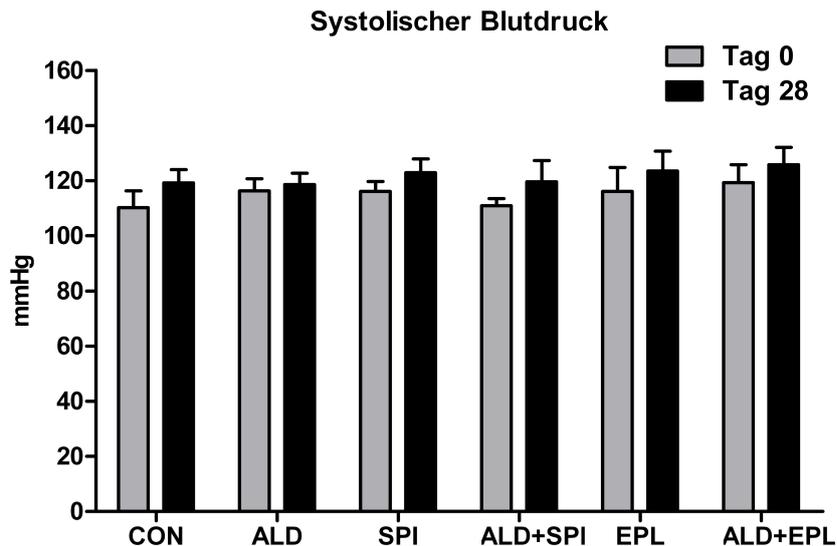


Abbildung 19: Auswertung des systolischen Blutdrucks

Innerhalb jeder Tiergruppe kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen des systolischen Blutdrucks vor (Tag 0) und nach Pumpenimplantation (Tag 28). Auch der Vergleich der Gruppen untereinander zeigt keine Veränderungen des Blutdrucks in Abhängigkeit von der Behandlung der Tiere. n=8 pro Bedingung

4.4 Elektrolyte und Creatinin

Die Elektrolyte wurden aus dem Plasma der Ratten nach Versuchsende bestimmt, um durch Aldosteron verursachte Veränderungen darzustellen. Insbesondere Störungen im Kaliumhaushalt könnten dazu führen, dass die auf mRNA- und Proteinebene untersuchten Kanäle verändert sind, was nicht durch eine direkte Aldosteronwirkung vermittelt wird, sondern indirekt eine Folge der schwankenden Elektrolytkonzentrationen darstellen könnte. Die Aldosterondosis, die den Ratten appliziert wurde, wurde im Vorversuch so festgelegt, dass es zu keinen Veränderungen im Elektrolythaushalt kam. Dies konnte im eigentlichen Versuch reproduziert werden. So zeigen die Versuchsgruppen keine signifikant

abweichenden Elektrolytplasmaspiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tabelle 4, n=8). Lediglich Ratten, die mit Eplerenon behandelt wurden (EPL), weisen signifikant erhöhte Kaliumplasmaspiegel im Vergleich zu den Kontrolltieren (CON) auf. Dieser Effekt tritt bei der Behandlung mit Eplerenon auch bei einigen Patienten auf, da es systemisch zu einer gesteigerten Na⁺- Ausscheidung und damit zu einer erhöhten Rückresorption von K⁺-Ionen in der Niere kommt, so dass eine Überwachung der Kaliumspiegel induziert ist. Die gemessenen Kaliumwerte korrelieren gut mit den in der Literatur beschriebenen Werten für Wistar-Ratten im Bereich von 3,8-5,6 mmol/l, bezogen auf das Geschlecht und das Alter der Tiere (Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal Inc.). Um zu überprüfen, ob Aldosteron bzw. die Aldosteronantagonisten einen Effekt auf die Nierenfunktion der Tiere haben, wurden bei diesen ebenfalls die Creatinin-Spiegel im Plasma bestimmt. Die Werte sind in allen Tieren unverändert.

| Parameter | CON | ALD | SPI | ALD+SPI | EPL | ALD+EPL |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Kalium (mmol/l) | 3,90±0,16 | 3,30±0,24 | 3,74±0,15 | 4,26±0,29 | 4,53±0,27* | 3,84±0,22 |
| Natrium (mmol/l) | 137,9±0,95 | 139,3±0,60 | 137,5±1,15 | 137,3±0,98 | 139,4±0,80 | 139,6±0,82 |
| Chlorid (mmol/l) | 95,8±0,73 | 94,5±0,98 | 96,3±0,59 | 95,1±0,48 | 98,1±1,22 | 97,9±1,06 |
| Creatinin (mg/dl) | 0,189±0,005 | 0,193±0,009 | 0,203±0,018 | 0,214±0,021 | 0,219±0,007 | 0,219±0,014 |

Tabelle 4: Elektrolyt- und Creatininwerte nach vierwöchiger Versuchsdauer

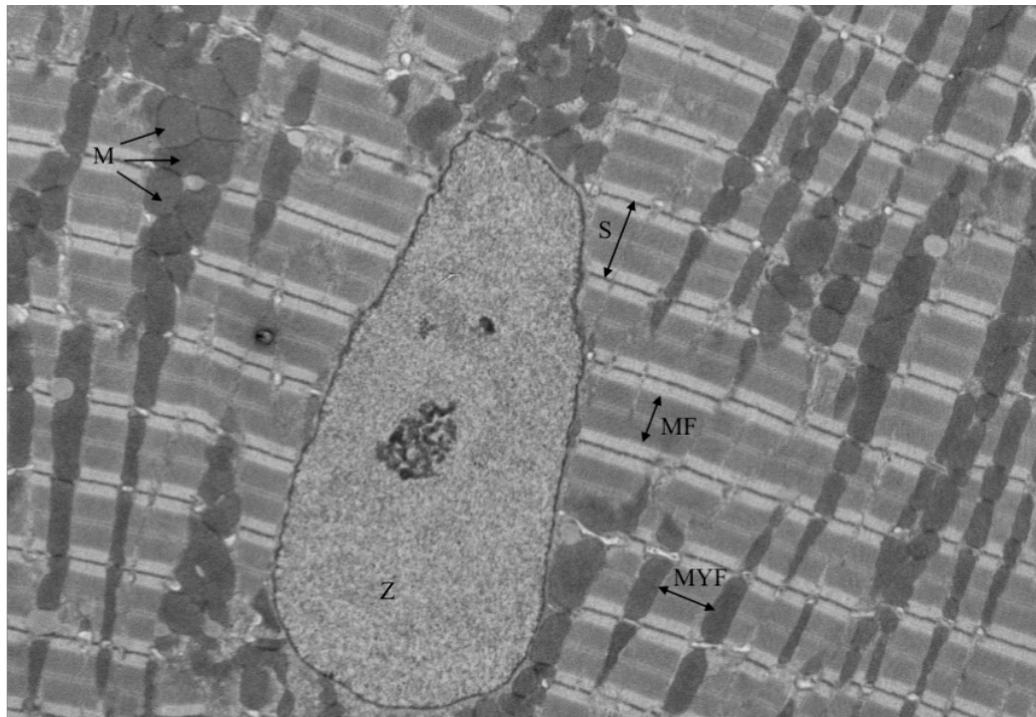
Die Elektrolytwerte wurden im Plasma der Tiere bestimmt und sind in ALD, SPI, ALD+SPI, EPL und ALD+EPL gegenüber der Kontrollgruppe unverändert. Lediglich Kontrolltiere, die Eplerenonfutter erhielten (EPL), zeigen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Kaliumwerte. Die Creatinin-Bestimmung im Plasma weist ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in den Gruppen auf. n=8 pro Bedingung, *P<0,05 gegenüber der Kontrollgruppe (CON)

4.5 Elektronenmikroskopische Veränderungen am Herzen

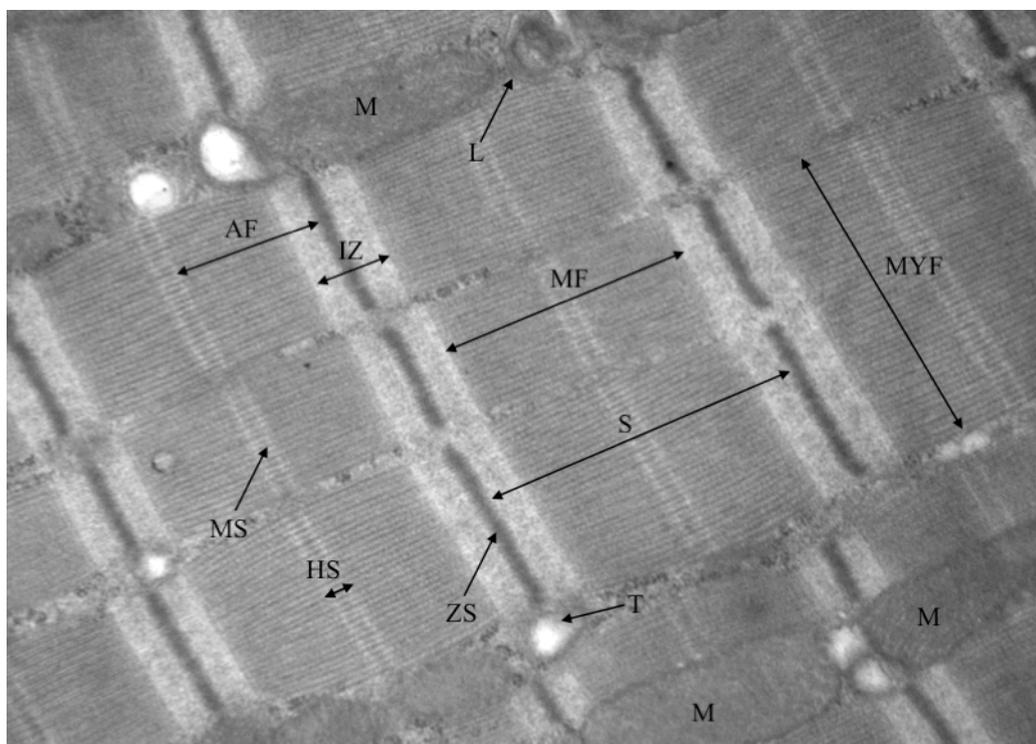
Die typische Struktur des Herzmuskels ist in Abbildung 21 im Longitudinalschnitt zu sehen.

Die funktionelle Grundeinheit stellt das Sarkomer (S) dar. Typische Teilstrukturen sind die Myofibrillen (MYF), bestehend aus Aktin- (AF) und Myosinfilament (MF). Der Z-Streifen

(ZS) entspricht der Verbindung der Aktinfilamente untereinander. Die Verbindung der Myosinfilamente liegt in dem sogenannten M-Streifen (MS). Zwischen den Myofibrillen sind Mitochondrien (M) vom Cristae-Typ regelmäßig angeordnet.



3000x



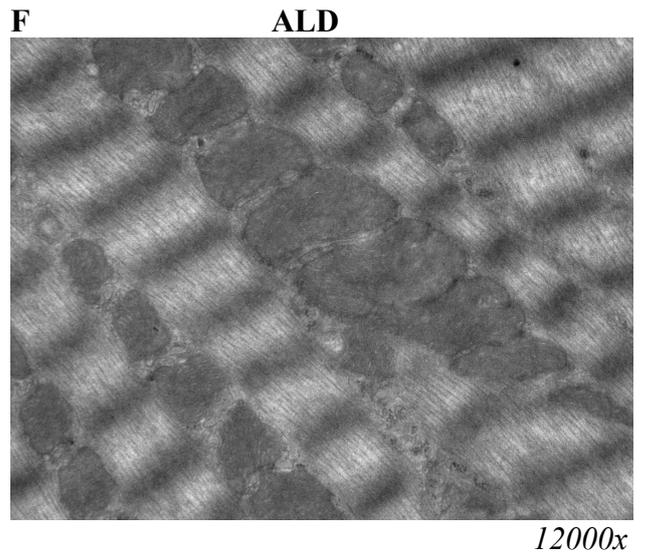
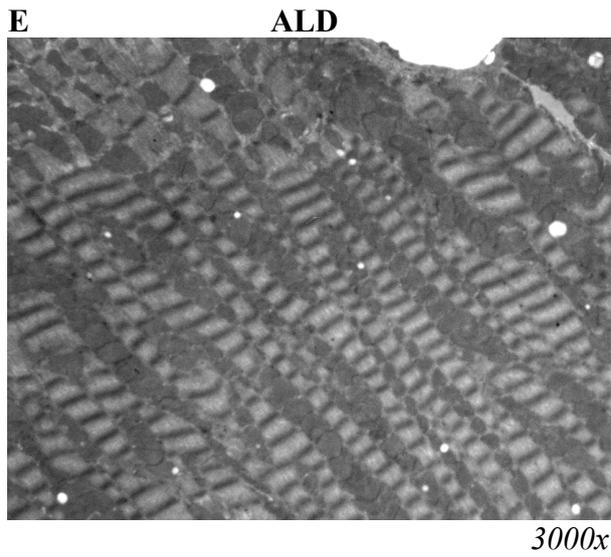
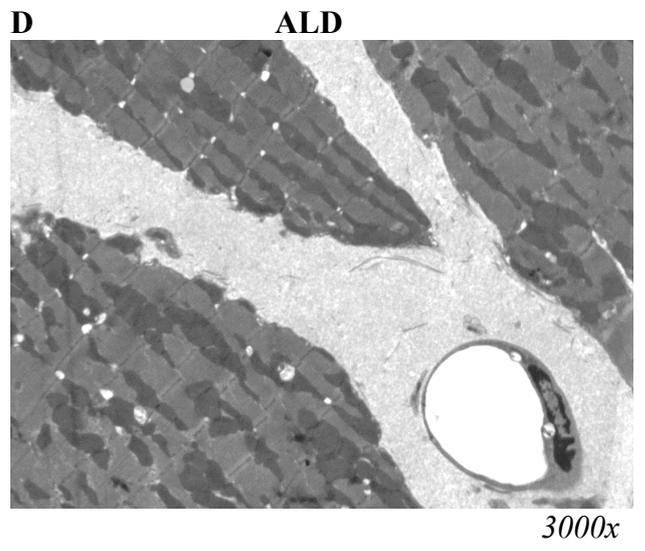
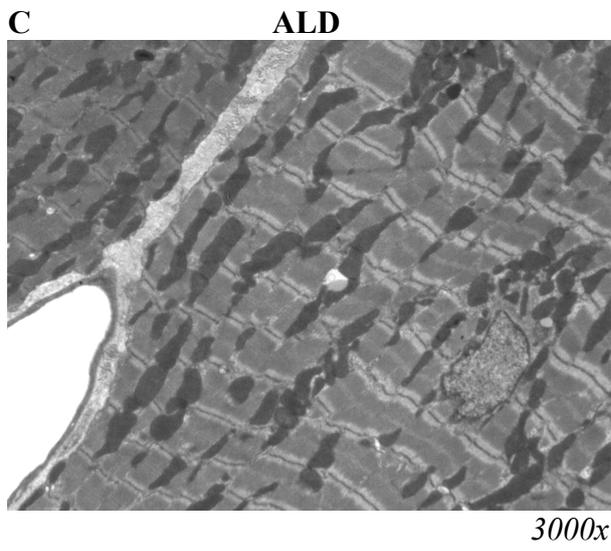
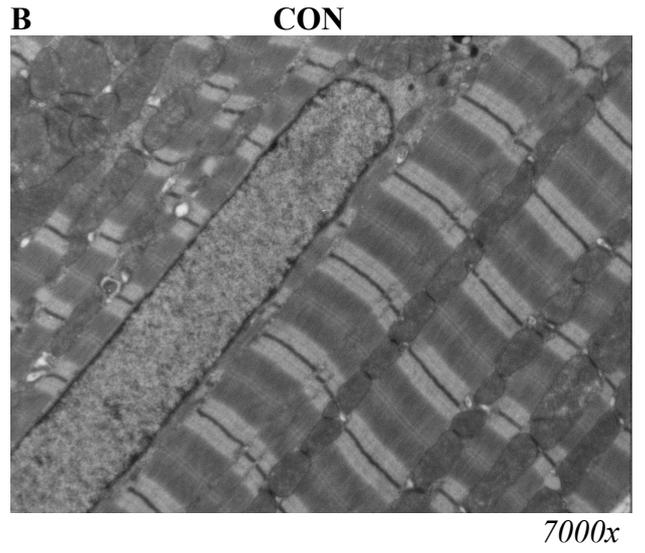
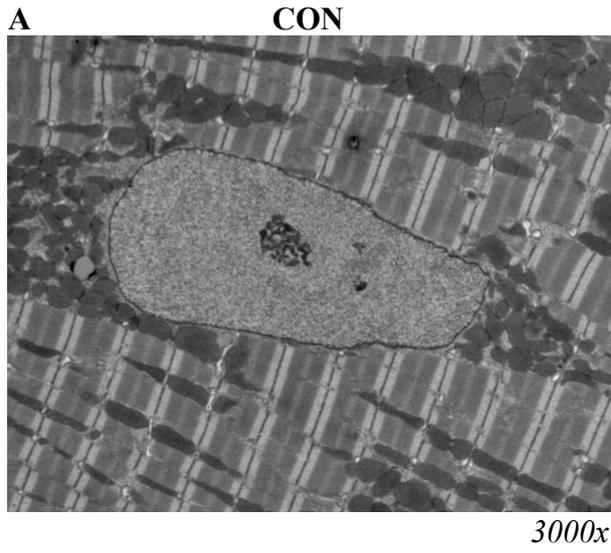
12.000x

Abbildung 21: Aufbau des Herzmuskels

AF: Aktinfilament, HS: Hensenscher (heller) Streifen, IZ: Isotrope Zone, L: L-Tubuli, M: Mitochondrien, MF: Myosinfilament, MS: M-Streifen, MYF: Myofibrille, S: Sarkomer, T: T-Tubuli, Z: Zellkern, ZS: Z-Streifen

Um strukturelle Veränderungen bei den Tiergruppen zu untersuchen, wurden von den Tieren elektronenmikroskopische Schnitte des linken Ventrikels ausgewertet. In Abbildung 22 sind repräsentative Aufnahmen der Tiergruppen dargestellt. In Abbildung 22A und B sind Longitudinalschnitte von Kontrollherzen abgebildet. Es liegt eine intakte Struktur der Myofibrillen mit regelrecht strukturierten Mitochondrienpopulationen vor. Ebenfalls zeigten sich wenig Kollageneinlagerungen und ein intaktes T- und L-Tubulussystem sowie intakte Nuklei. Abbildungen 22C-F zeigen Aufnahmen des linken Ventrikels nach vierwöchiger Aldosteronexposition. In Abbildung 22C wird deutlich, dass das Sarkomer unregelmäßig angeordnet ist. Die Folge können Erregungsleitungsstörungen und veränderte Kontraktion sein. Die Mitochondrien sind in ihrer Funktion allerdings nicht gestört. Zusätzlich kommt es zu teilweise massiven perivaskulären und interstitiellen Einlagerungen von Kollagen (Abbildungen 22C und D). In Abbildung 22D ist ein weitgestelltes T-Tubulussystem anhand der hellen Strukturen zwischen den Sarkomeren zu erkennen. Abbildung 22E weist sogenannte Kontraktionsbänder auf (in Abbildung 22F vergrößert dargestellt), die nur in Aldosteron stimulierten Herzen detektiert wurden. Diese deuten auf eine Überkontraktion des Herzmuskels hin, was durch einen veränderten Calciumhaushalt bedingt sein könnte.

Die Abbildungen 22G und H zeigen Herzschnitte Aldosteron exponierter Ratten, die mit Spironolacton behandelt wurden (ALD+SPI) mit intaktem linksventrikulärem Myokard. Das T-Tubulussystem ist auch hier erweitert (Abbildung 22H) und es liegen unregelmäßige Sarkomere vor. Die Veränderungen sind allerdings im Vergleich zu denen der Aldosteron exponierten Tiere viel diskreter. Die Herzmuskulatur weist ebenfalls weniger Kollageneinlagerungen auf als in der ALD-Gruppe.



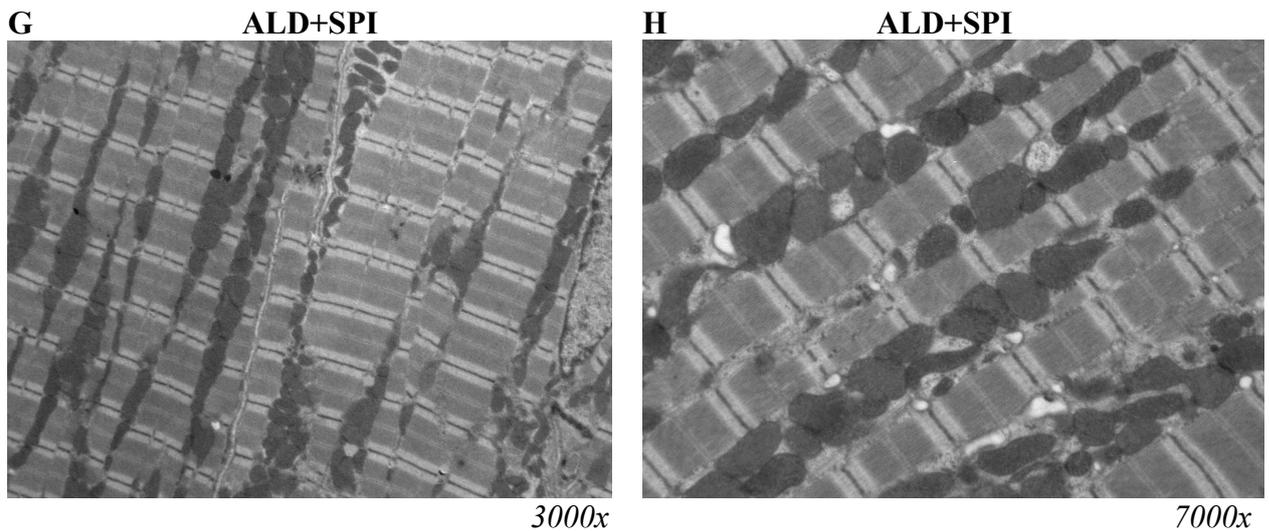


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Herzmuskels (linker Ventrikel)

A+B: Kontrolltier mit intaktem Myokard im Longitudinalschnitt in zwei verschiedenen Vergrößerungen

C-F: Myokard Aldosteron-exponierter Tiere mit unregelmäßigem Sarkomer, weitgestelltem T-Tubulussystem, Kollageneinlagerungen sowie Kontraktionsbändern.

G+H: Myokard der ALD+SPI Tiere. Auch hier ist das Sarkomer unregelmäßig mit einem leicht erweiterten T-Tubulussystem. Im Vergleich zu ALD sind die Veränderungen viel diskreter und es liegen weniger Kollageneinlagerungen vor.

4.6 Elektrophysiologische Veränderungen am Herzen

Um den Phänotyp besser beurteilen zu können, wurden zusätzlich elektrophysiologische Veränderungen im Herzen untersucht. Dazu wurde das MKG nach vierwöchiger Aldosteron-Exposition am narkotisierten Tier aufgezeichnet. In Abbildung 23 sind die MKG-Zeitverlaufskurven des Inhomogenitätsindex (IHi) für jede Gruppe dargestellt. Nach vier Wochen entwickelten die Aldosterontiere einen verbreiterten QRS-Komplex sowie eine erhöhte R-Amplitude gegenüber den Kontrolltieren. Auch die Repolarisation ist unter ALD verzögert, was sich in einer verbreiterten T-Welle widerspiegelt. Die mit den Aldosteronantagonisten behandelten Tiere entwickelten keine signifikanten Unterschiede in den MKG-Zeitverlaufskurven im Vergleich zu CON.

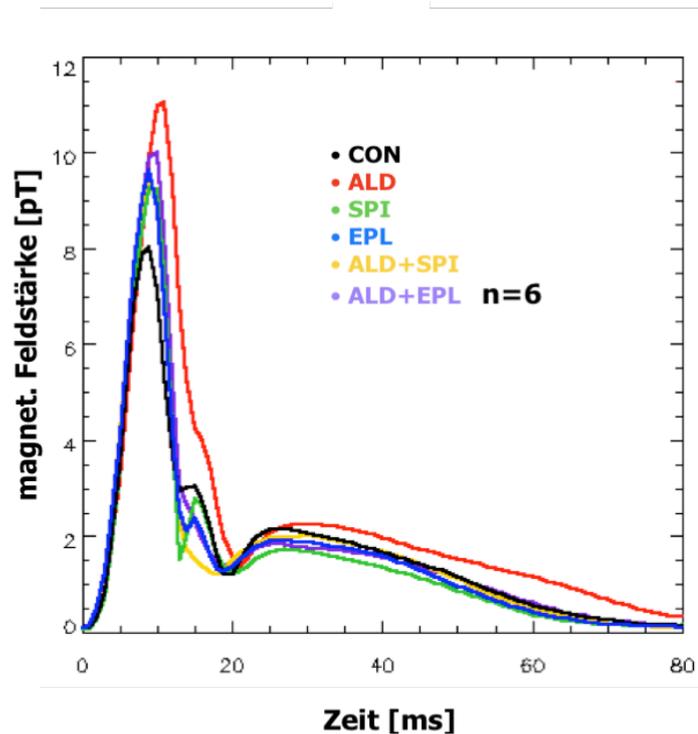


Abbildung 23: Zusammenfassung der MKG-Zeitverlaufskurven aller Tiergruppen

Dargestellt ist die magnetische Feldstärke (pT) gegen die Zeit (ms). Die Kurven resultieren aus den gemittelten Daten aller Tiere (n=6 für jede Gruppe). Aldosteron-exponierte Tiere (rot) zeigen nach vier Wochen eine erhöhte R-Amplitude sowie eine verzögerte Repolarisation im Vergleich zu CON. Aldosteronantagonisten weisen im Vergleich zu CON keine Veränderungen in den MKG-Zeitverlaufskurven auf (SPI, EPL) und können Aldosteron-induzierte Abweichungen verhindern.

Die Auswertung der einzelnen Parameter, die im MKG bestimmt wurden, zeigen in ALD im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant erhöhte R-Amplitude ($18,6 \pm 0,5$ pT in ALD zu $13,8 \pm 0,9$ pT in CON, $P < 0,05$), wobei die MR-Antagonisten Spironolacton und Eplerenon diesen Effekt abmildern konnten (ALD+SPI $15,6 \pm 1,1$ pT und ALD+EPL $16,8 \pm 1,2$ pT) (Abbildung 24). Die Zunahme der R-Amplitude in ALD belegt die Aldosteron abhängige Ausbildung des linksventrikulären hypertrophen Phänotyps.

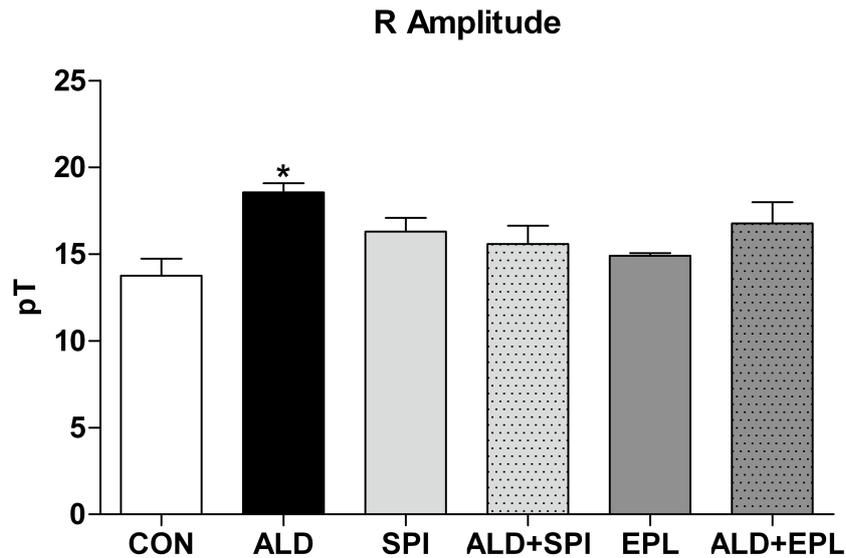


Abbildung 24: Auswertung der R-Amplitudenhöhe

Unter ALD kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der R-Amplitude im Vergleich zu CON. Spironolacton und Eplerenon weisen Werte auf Kontrollniveau auf und verhindern eine Erhöhung der R-Amplitude unter Aldosteron. n=6, *P<0,05 gegenüber CON

In Abbildung 25 ist die Auswertung des QRS Komplexes für jede Gruppe dargestellt. Der QRS-Komplex beschreibt die Erregungsausbreitung im Ventrikel. In ALD kommt es zu einer signifikanten QRS-Verbreiterung ($20,8 \pm 0,7$ ms in ALD zu $18,7 \pm 0,6$ ms in CON, $P < 0,05$ gegenüber CON). In ALD+SPI und in ALD+EPL ist das QRS Intervall im Vergleich zu der Aldosteron-Gruppe signifikant verkürzt, wobei die ALD+SPI Gruppe im Gegensatz zu der Kontrollgruppe sogar einen signifikant verkürzten QRS Komplex ($16,2 \pm 0,6$ ms, $P < 0,05$) entwickelt.

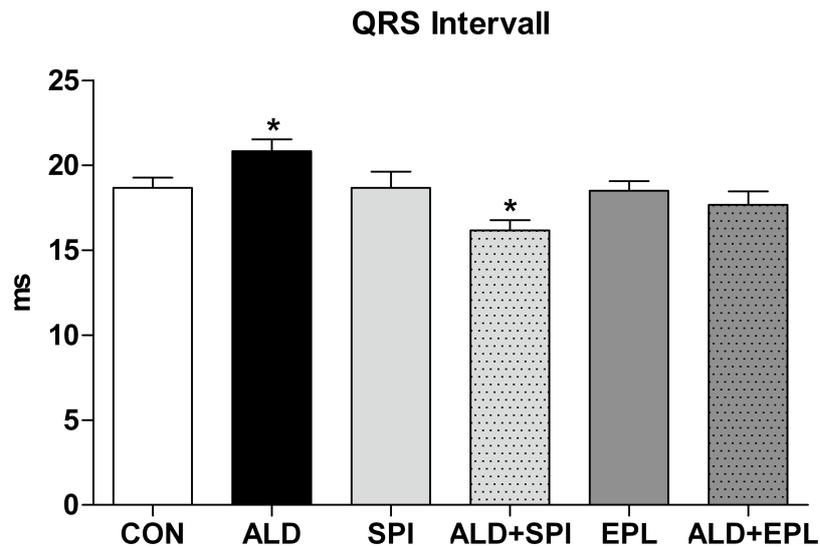


Abbildung 25: MKG-Auswertung des QRS Komplexes

Unter ALD kommt es zu einer signifikanten Verbreiterung des QRS-Komplexes, die durch die Antagonisten inhibiert werden kann. In ALD+SPI kommt es gegenüber der Kontrollgruppe zu einem verkürzten QRS-Komplex. SPI und EPL zeigen keine Veränderungen in Bezug auf die QRS-Breite. * $P < 0,05$ gegenüber CON

Das QT Intervall, das die ventrikuläre Depolarisation und Repolarisation im Aktionspotential beschreibt, ist in Aldosteron exponierten Tieren im Gegensatz zu der Kontrollgruppe signifikant verlängert (ALD $86,5 \pm 3,4$ ms zu CON $73,8 \pm 1,5$ ms, $P < 0,01$) (Abbildung 26 rechts). Beide Aldosteronantagonisten waren jedoch in der Lage, die Verlängerung der QT-Zeit unter Aldosteron zu verhindern (ALD+SPI $71,3 \pm 1,3$ ms, $P < 0,001$ zu ALD; ALD+EPL $76,8 \pm 2,5$ ms, $P < 0,05$ zu ALD). Die Herzfrequenz zeigte keine signifikanten Veränderungen in den einzelnen Tiergruppen (Abbildung 26 links), so dass die unkorrigierte QT-Zeit ausgewertet werden konnte.

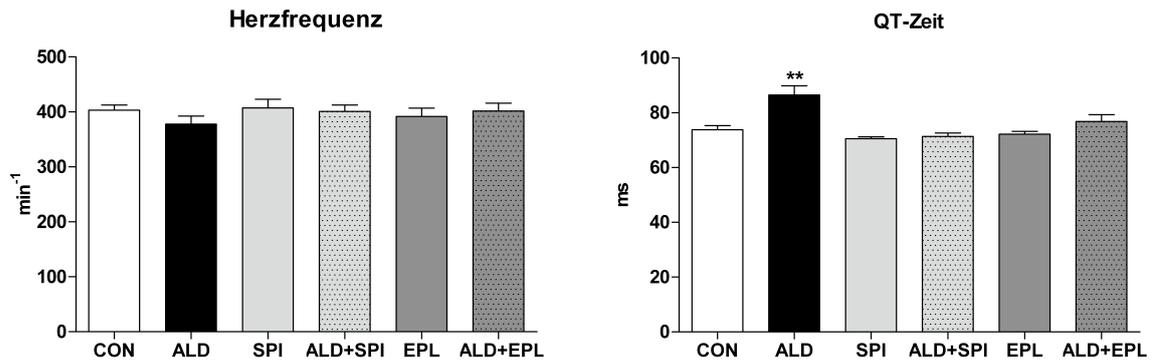


Abbildung 26: Darstellung der Parameter für Herzfrequenz und QT-Zeit

Die Herzfrequenz zeigt im MKG keine signifikanten Abweichungen in ALD, SPI, ALD+SPI, EPL und ALD+EPL verglichen mit CON (links). Unter ALD kommt es zu einer hochsignifikanten QT-Zeit Verlängerung, die durch Spironolacton und Eplerenon verhindert werden konnte. Allein zeigen die Aldosteronantagonisten keine von der Kontrollgruppe abweichenden QT-Zeiten (rechts). $n=6$; $**P<0,01$ gegenüber CON

Weiterhin wurde im MKG das die Repolarisation beschreibende $T_{\text{peak}}-T_{\text{end}}$ Intervall ermittelt (Abbildung 27), das in der ALD-Gruppe signifikant verbreitert vorlag ($57,3\pm 4,1$ ms zu $47,7\pm 0,9$ ms in CON; $P<0,05$) und wesentlich das verlängerte QT-Intervall verursacht. Die mit Spironolacton behandelten ALD-Tiere (ALD+SPI) entwickelten im Gegensatz zu Eplerenon ein gegenüber ALD signifikant verkürztes $T_{\text{peak}}-T_{\text{end}}$ Intervall (ALD+SPI $45,5\pm 0,9$ ms, $P<0,01$). ALD+EPL zeigte gegenüber der ALD-Gruppe eine Abnahme des $T_{\text{peak}}-T_{\text{end}}$ Intervalls, die aber keine Signifikanz erreichte (ALD+EPL $52,0\pm 2,0$ ms, $P>0,05$).

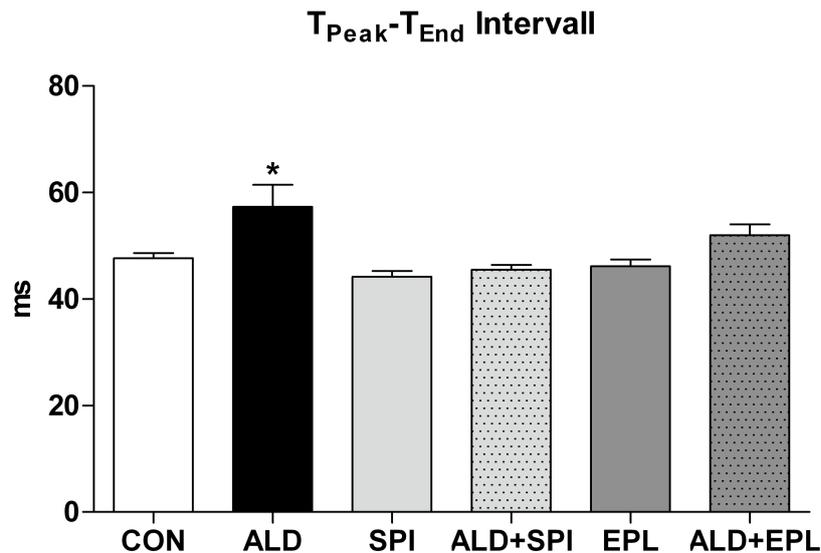


Abbildung 27: Auswertung des T_{peak}-T_{end} Intervalls (MKG)

Das T_{peak}-T_{end} Intervall ist in der ALD-Gruppe signifikant verlängert gegenüber CON. Dies spricht für eine verzögerte Repolarisation und ist hauptsächlich für die Verzögerung des QT-Intervalls verantwortlich. Auch hier sind die Aldosteronantagonisten in der Lage, die unter Aldosteron auftretende verzögerte Repolarisation zu unterbinden. n=6; *P<0,05 gegenüber CON

Die Ergebnisse aus den Langzeit-EKG Aufzeichnungen nach drei Wochen Aldosteronexposition bestätigen die elektrischen Veränderungen am Herzen, die im MKG bestimmt werden konnten und geben zusätzliche Hinweise auf Erregungsbildungs- und Erregungsweiterleitungsstörungen. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass das Ratten-EKG Unterschiede zum menschlichen EKG aufweist. So fehlt im Ratten-EKG die ST-Strecke, die T-Welle folgt somit unmittelbar auf den QRS-Komplex. Dies ist auf eine zeitliche Überlagerung der Repolarisations- und Depolarisationsvorgänge im Myokard zurückzuführen. Ein weiterer Unterschied liegt in einer fehlenden isoelektrischen Linie, wie sie beim Menschen vorkommt sowie der fehlenden Q-Zacke. Interessant ist auch, dass es bei Ratten zu der Ausbildung von Kammerflimmern kommen kann, das sich spontan zurückbildet. Außer diesen Alterationen weist das Ratten-EKG aber alle Charakteristika eines menschlichen EKG auf. Die Auswertung des Langzeit-EKGs wurde anhand der „Lambeth Convention Criteria“ (Walker et al. 1988) vorgenommen.

In Abbildung 28 ist eine repräsentative EKG-Spur einer Kontrollratte dargestellt, mit der P-Welle für die Erregung im Vorhof, dem QRS-Komplex, der die Erregung im Ventrikel beschreibt sowie der direkt anschließenden T-Welle, die die Repolarisation anzeigt.

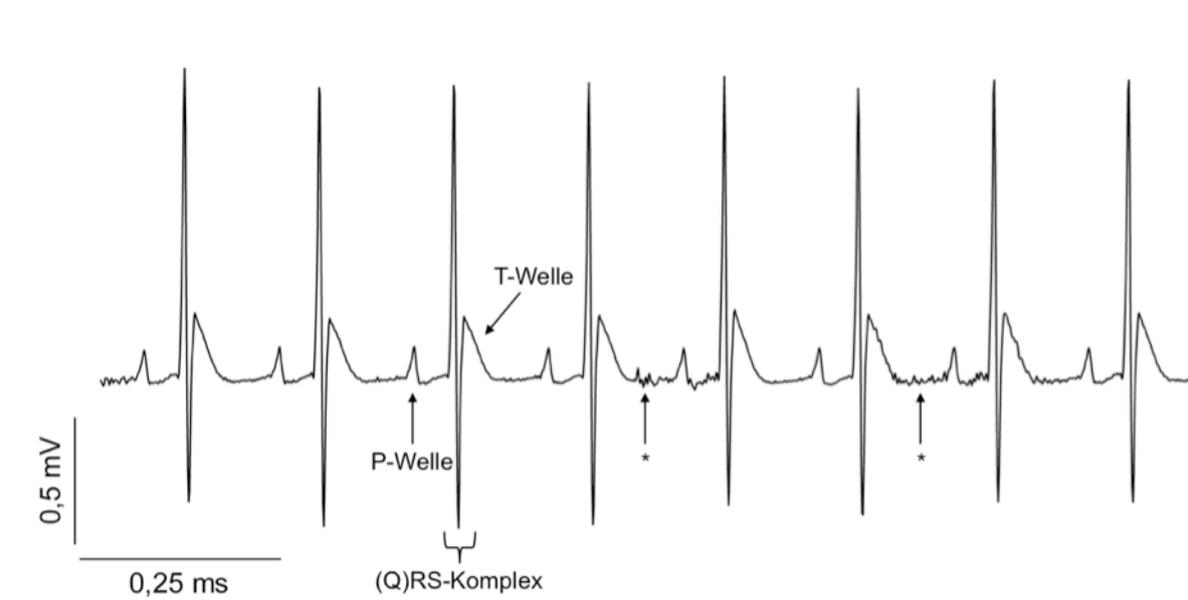


Abbildung 28: Sinusrhythmus einer Kontroll-Ratte (Eindthoven II-Ableitung)

Detektiert werden die P-Welle, der QRS-Komplex, wobei die Q-Zacke im EKG der Ratte kaum ausgeprägt ist und die direkt auf den QRS-Komplex folgende T-Welle. Es fehlt die ST-Strecke und häufig auch die isoelektrische Linie im Vergleich zum EKG des Menschen. *Respirationsartefakte

Die Tiere zeigen im EKG nach dreiwöchiger Aldosteronstimulation ein vermehrtes Auftreten von ventrikulären Extrasystolen im Vergleich zu den anderen Tiergruppen. Dabei wurde das 24h-EKG ausgewertet und die Häufigkeit der Extrasystolen wurde pro Stunde berechnet ($66,8 \pm 59,3$ ventrikuläre Extrasystolen/h in ALD gegenüber CON mit $0,2 \pm 0,09$ ventrikuläre Extrasystolen/h), erreichte aber keine Signifikanz (Abbildung 29+30).

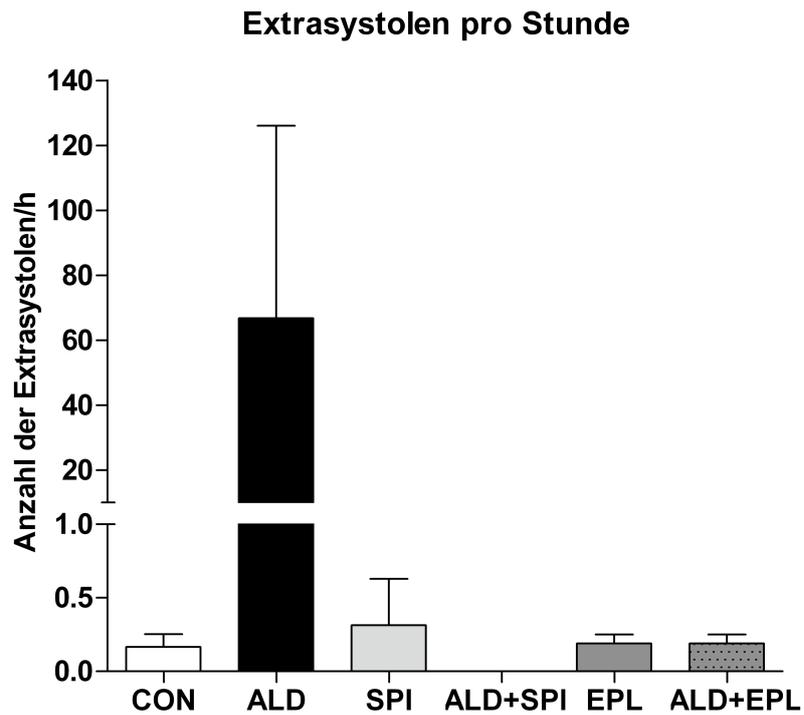
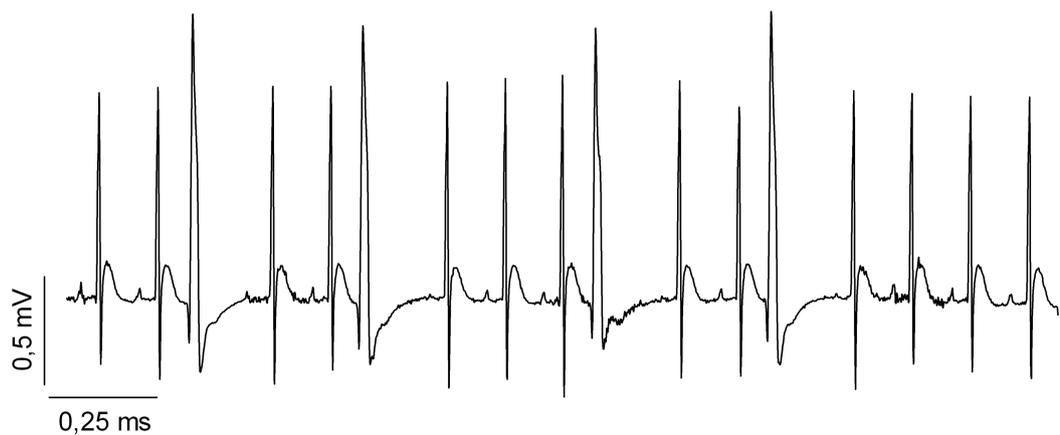


Abbildung 29: Quantifizierung der ventrikulären Extrasystolen

Anzahl der im 24h-EKG auftretenden ventrikulären Extrasystolen berechnet auf eine Stunde nach dreiwöchiger Aldosteron-Exposition in jeder Tiergruppe. In ALD kommt es zu einer Häufung auftretender Extrasystolen vom ventrikulären Typ, es wird aber aufgrund der geringen Tierzahl pro Gruppe keine Signifikanz erreicht. n=3

A



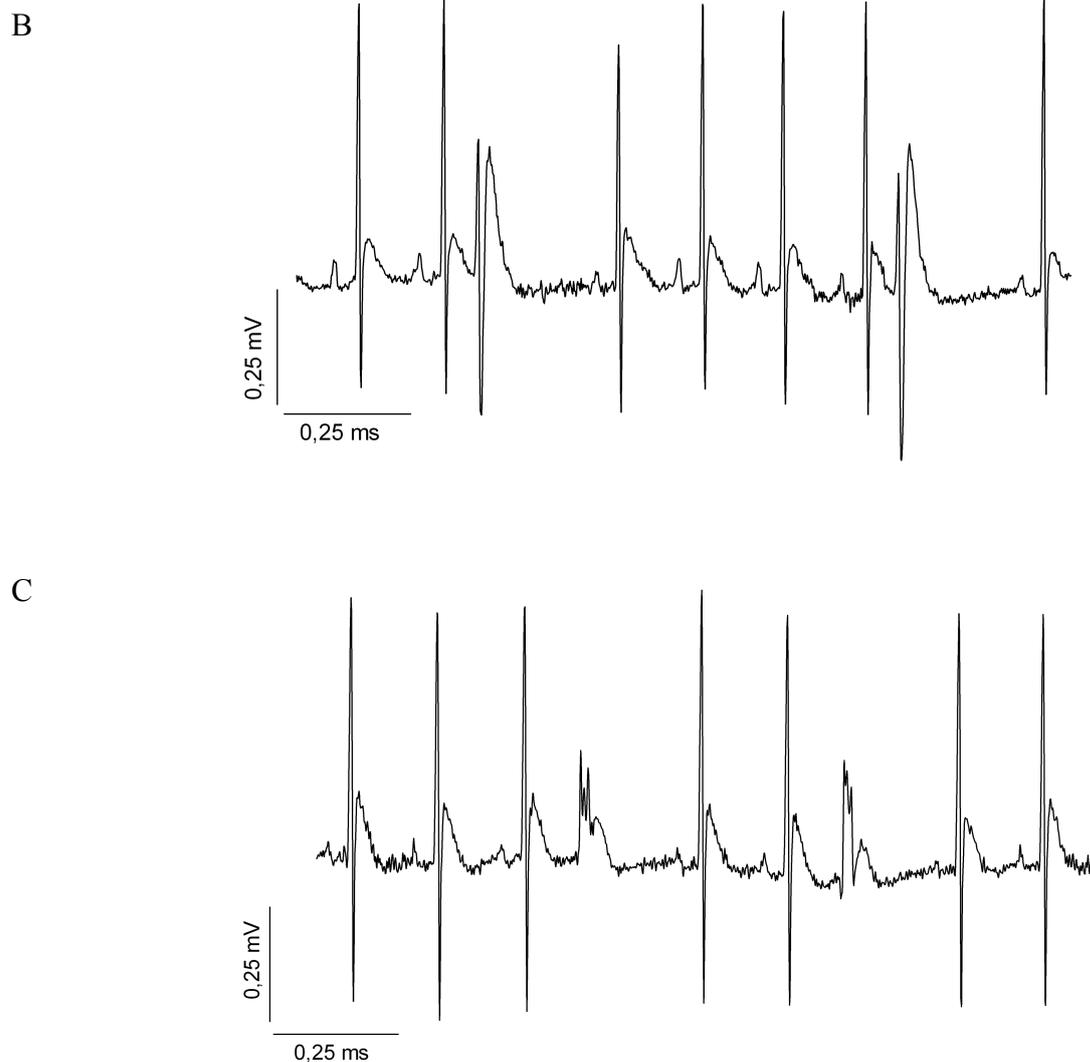
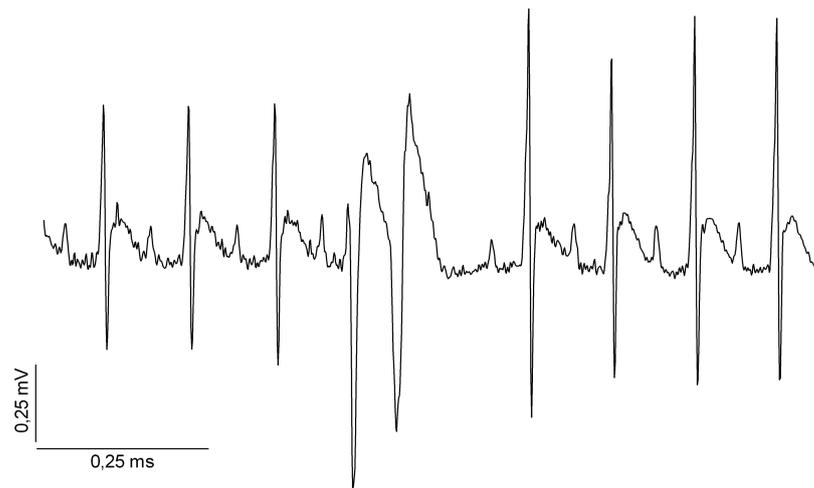


Abbildung 30: Auftreten von Extrasystolen im 24h-EKG nach 3 Wochen

Repräsentative EKG-Aufzeichnungen mit ventrikulären Extrasystolen in Aldosteron-exponierten Ratten. *A* Frequentiert auftretende ventrikuläre Extrasystolen wurden in einem Aldosteron exponierten Tier gefunden *B* EKG-Spur aus einem ALD-Tier mit Extrasystolen vom ventrikulären Typ. Dieser Phänotyp wurde auch in anderen Tiergruppen detektiert. *C* Extrasystolen dieser Ausprägung fanden sich nur in einem ALD-Tier.

Weitere Auffälligkeiten im EKG Aldosteron exponierter Tiere sind in Abbildung 31 dargestellt. Zwei oder drei nacheinander auftretende ventrikuläre Extrasystolen werden in den „*Lambeth Convention Criteria*“ als Couplets (2) oder Salven definiert und wurden bei den Aldosteron-exponierten Ratten detektiert (Abbildung 31A). Das Auftreten einer ventrikulären Tachykardie, die als Folge von vier oder mehr ventrikulären Extrasystolen definiert wird, findet sich ausschließlich in der Aldosteron-Gruppe (Abbildung 31B+C).

A



B



C

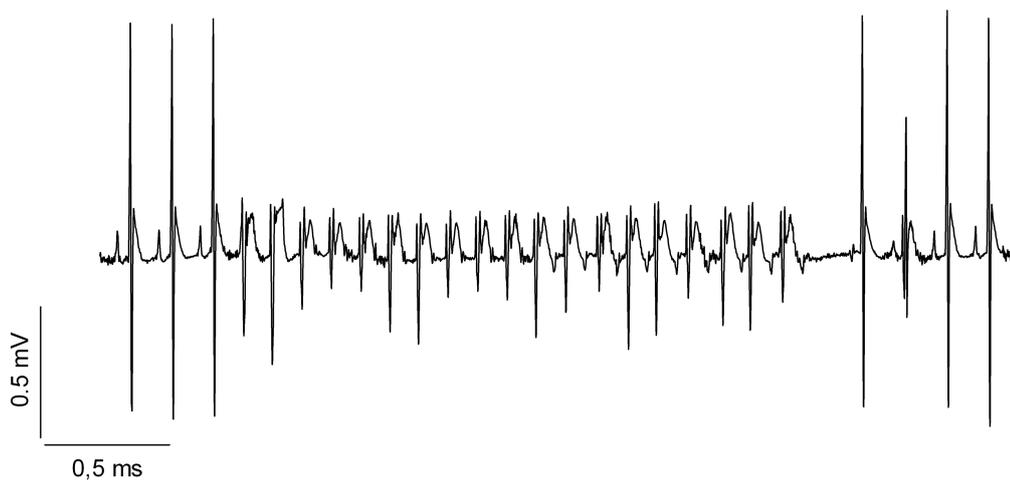


Abbildung 31: Couplet, Salven und Ventrikuläre Tachykardie

Die hier dargestellten EKG-Veränderungen wurden in den EKG-Aufzeichnungen Aldosteron-exponierter Ratten detektiert, nicht aber in Kontrolltieren oder in mit den Aldosteron-Antagonisten behandelten Tieren. *A* Auftreten eines Couplets in einem ALD-Tier. *B* Salven bzw. kurz auftretende ventrikuläre Tachykardie in ALD. *C* In einem ALD-Tier kam es zu einer längeranhaltenden ventrikulären Tachykardie.

In allen Tieren wurden atrioventrikuläre Überleitungsstörungen aufgezeichnet, wie in Abbildung 32 dargestellt ist. Die quantitative Auswertung der Häufigkeit auftretender AV-Überleitungsstörungen zeigte keine Unterschiede in den einzelnen Tiergruppen (Abbildung 33).

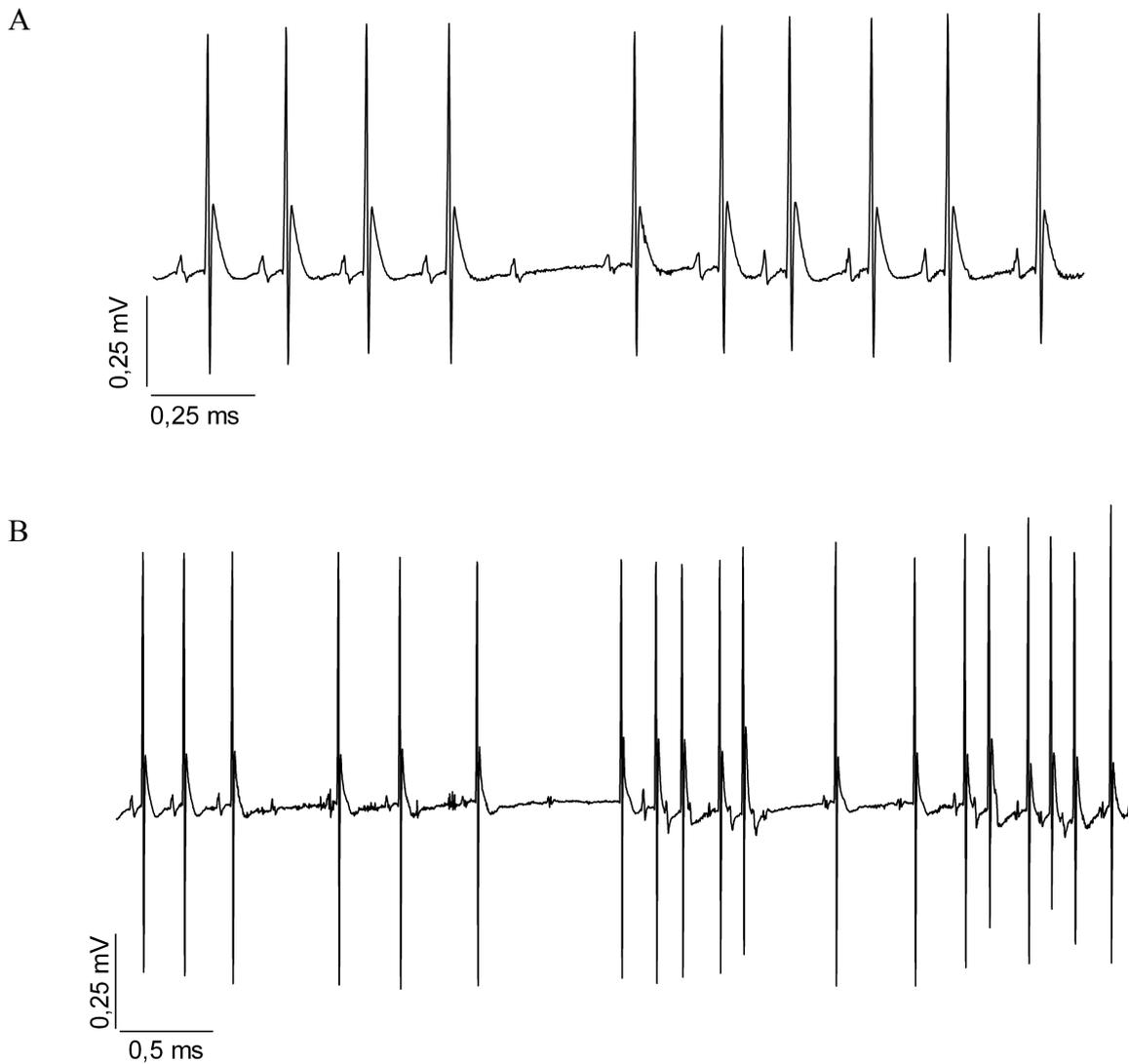


Abbildung 32: Detektierte AV-Blöcke nach drei Wochen im 24h-EKG

In allen Tiergruppen kam es zu der Ausbildung atrioventrikulärer Überleitungsstörungen (AV-Blöcken) verschiedener Ausprägung, die bei quantitativer Auswertung keine Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens zwischen den einzelnen Tiergruppen zeigten. *A* Darstellung einer nicht übergeleiteten P-Welle (*Non-conducted P-wave*) hier bei einem ALD+EPL-Tier *B* Repräsentative Spur eines auftretenden AV-Blocks detektiert bei einem ALD-Tier.

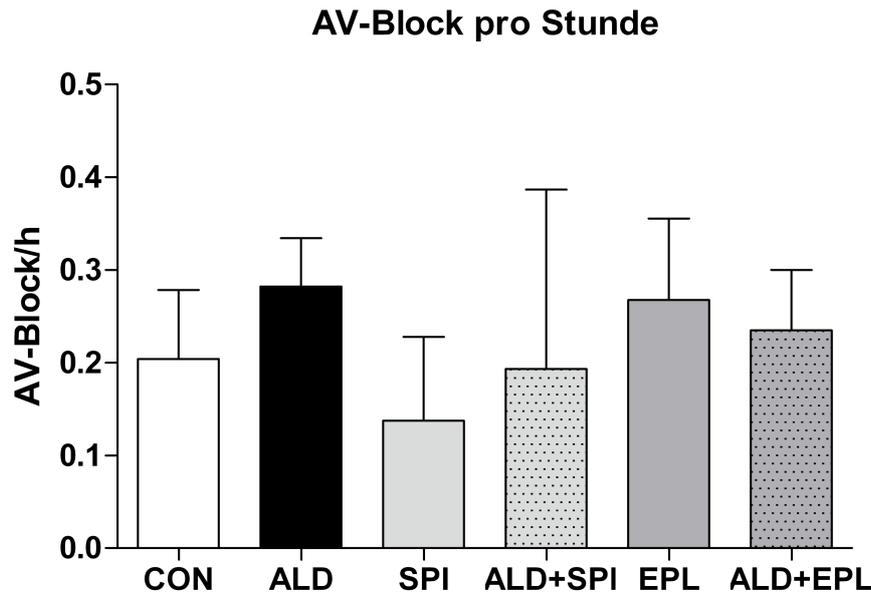


Abbildung 33: Häufigkeit atrioventrikulärer Überleitungsstörungen (AV- Blöcke)

Die Anzahl der AV-Blöcke im 24h-EKG wurde pro Stunde in allen Tiergruppen nach drei Wochen bestimmt. Dabei kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Tiergruppen. n=3

4.7 Ionenkanalexpression

Um Veränderungen auf zellulärer Ebene zu detektieren, die die makroskopisch erhobenen Daten erklären könnten, wurden Kalium- und Calciumkanäle, die im Herzen exprimiert werden, auf mRNA- und Proteinebene in linksventrikulärem Gewebe untersucht.

In Abbildung 34 ist die relative mRNA Expression der Untereinheiten Kv4.2 und Kv4.3 des spannungsabhängigen auswärtsgerichteten Kaliumstromes I_{to} dargestellt, der bei der frühen Repolarisationsphase während der Erregungsbildung und -weiterleitung im Herzen beteiligt ist. Beide Untereinheiten sind in der ALD-Gruppe signifikant niedriger exprimiert als in CON (Kv4.2: $0,59 \pm 0,08$ -fach; $P < 0,05$ und Kv4.3: $0,78 \pm 0,05$ -fach; $P < 0,01$). Tiere, die mit den Aldosteronantagonisten behandelt wurden, zeigen mRNA-Level auf Kontrollniveau (SPI $1,10 \pm 0,12$ -fach und $1,08 \pm 0,09$ -fach; ALD+SPI $0,75 \pm 0,08$ -fach und $0,87 \pm 0,05$ -fach; EPL $1,02 \pm 0,08$ -fach und $0,99 \pm 0,07$ -fach, ALD+EPL $0,93 \pm 0,14$ -fach und $0,99 \pm 0,05$ -fach; $P > 0,05$ gegenüber CON).

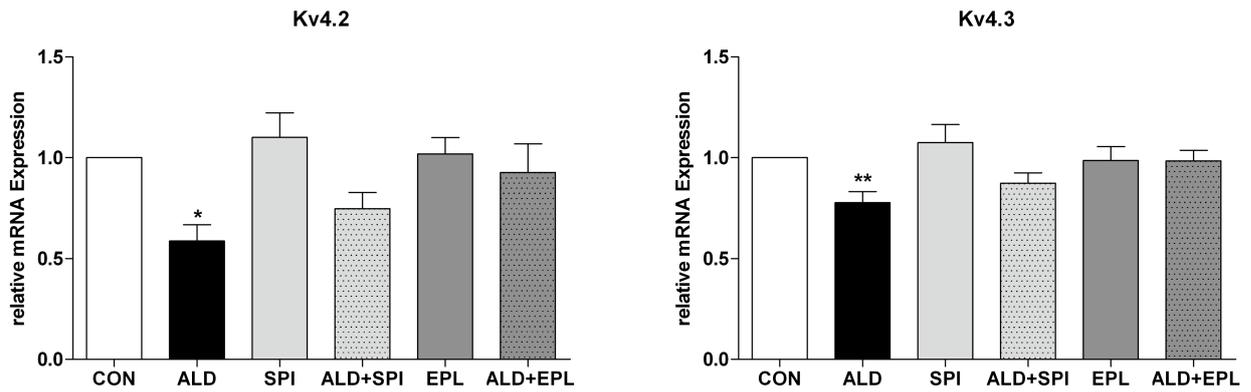


Abbildung 34: Relative mRNA Expression von Kv4.2 und Kv4.3 (I_{10})

In ALD kommt es zu einer signifikanten Downregulation beider Kanaluntereinheiten im Vergleich zu CON. Die Aldosteronantagonisten selbst haben keinen Effekt auf die Expression und sind in der Lage, die durch Aldosteron verursachte erniedrigte Expression zu verhindern. $n=8$; * $P<0,05$ und ** $P<0,01$ gegenüber CON

Western Blot Ergebnisse der Kanalproteine Kv4.2 und Kv4.3 in Abbildung 35 und 36 zeigen eine verringerte Proteinexpression in ALD-Tieren, die aber keine Signifikanz gegenüber den Kontrolltieren erreicht ($P>0,05$). Spironolacton und Eplerenon haben ebenso keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Kv4.2 und Kv4.3 ($P>0,05$).

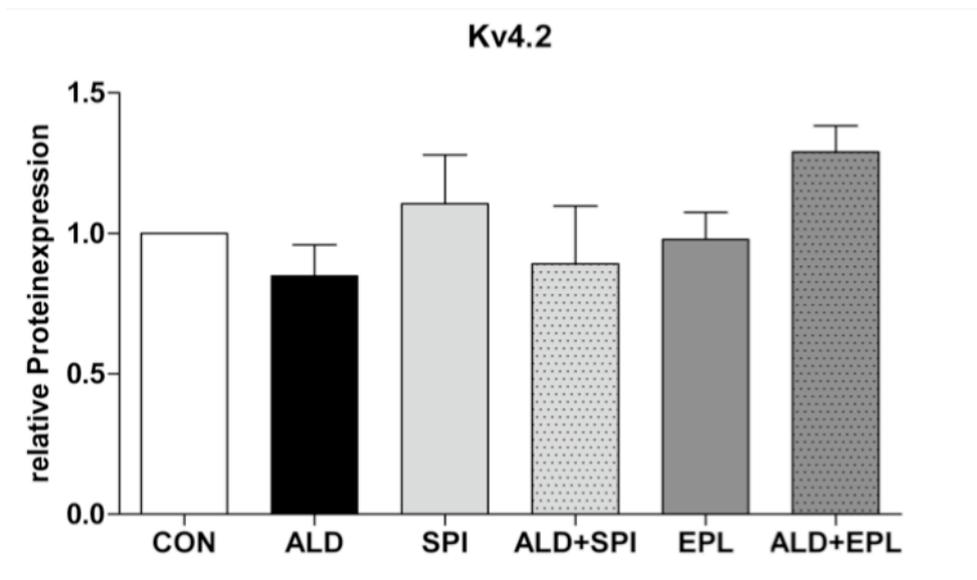


Abbildung 35: Relative Proteinexpression von Kv4.2

In Western-Blot Experimenten zeigt sich bei Kv4.2 keine signifikant veränderte Proteinexpression im Vergleich zu CON. Unter ALD kommt es zu einer leicht erniedrigten Expression, die aber keine statistische Signifikanz erreicht. $n=8$, $P>0,05$

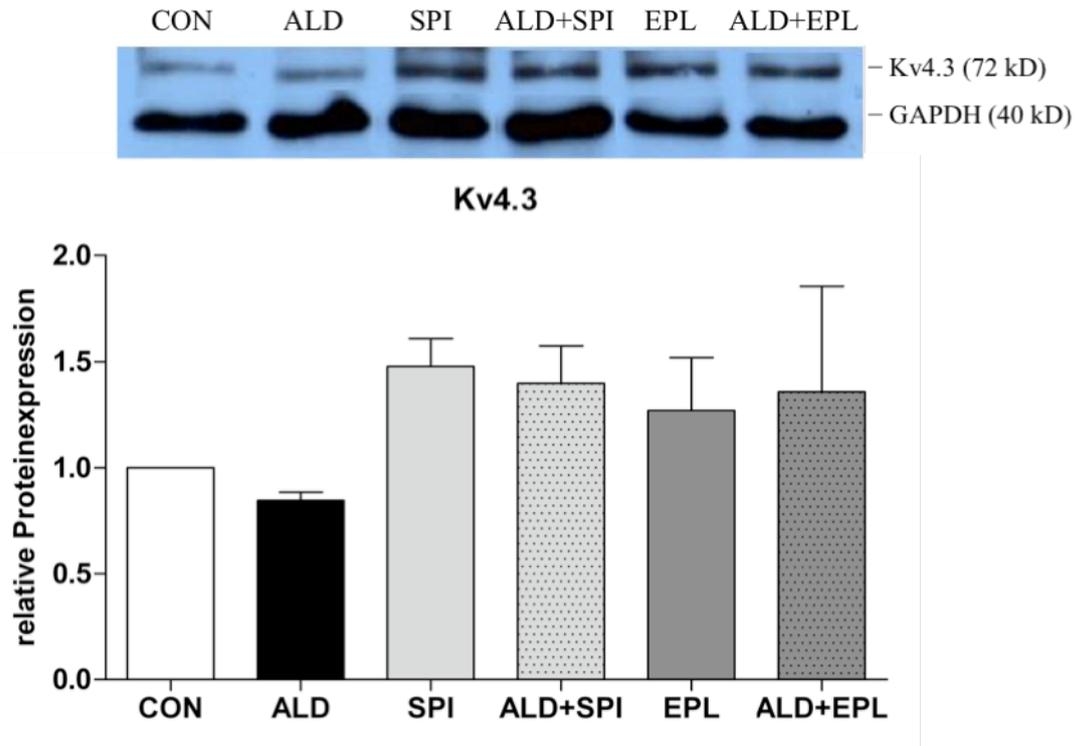


Abbildung 36: Relative Proteinexpression von Kv4.3

Auch die Proteinexpression der Kanaluntereinheit Kv4.3 des I_{K0} ist in ALD nur tendenziell erniedrigt gegenüber CON, erreicht aber ebenfalls keine statistische Signifikanz. Die Aldosteronantagonisten allein und in Aldosteron behandelten Tieren zeigen keine veränderte Proteinexpression der Kanaluntereinheit Kv4.3 gegenüber der Kontrollgruppe. $n=6$, $P>0,05$

Ein weiterer Kaliumstrom im Herzen ist der I_{Kur} , ein schnell aktivierbarer verzögert einsetzender gleichgerichteter Strom, der die schnelle Repolarisation im Aktionspotential steuert und dessen Untereinheit Kv1.5 darstellt. Diese Untereinheit ist bei chronischer Aldosteronexposition auf mRNA-Ebene hochsignifikant um circa 33% supprimiert ($0,67\pm 0,04$ -fach; $P<0,001$ gegenüber CON) (Abbildung 37). Die MR-Antagonisten können die durch Aldosteron verursachte Downregulation nicht verhindern und zeigen ebenfalls signifikant erniedrigte Expressionslevel der Kv1.5-mRNA im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($P<0,001$). Nur die Kontrolltiere, die Spironolacton und Eplerenon erhielten, zeigen keine veränderte Genexpression. In Western-Blot Experimenten konnte gezeigt werden, dass es unter Aldosteron ebenfalls zu einer signifikant verringerten Translation von Kv1.5 um circa 22% kommt ($0,78\pm 0,05$ -fach; $P<0,05$ gegenüber CON) (Abbildung 38), die

durch Spironolacton und Eplerenon verhindert werden konnte. SPI und EPL entwickelten im Vergleich zu CON keine signifikant veränderte Proteinexpression ($P > 0,05$ gegenüber CON).

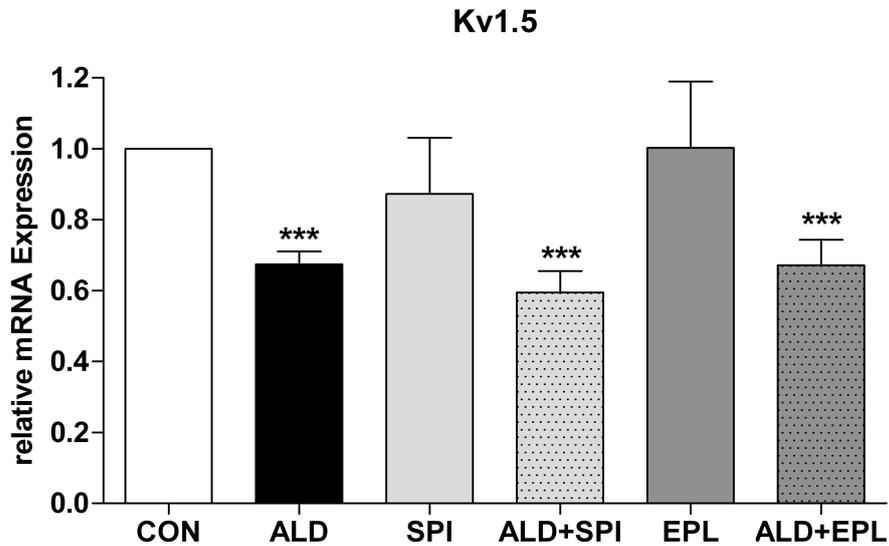


Abbildung 37: Relative mRNA Expression von Kv1.5

Aldosteron führt zu einer hochsignifikant erniedrigten mRNA Expression von Kv1.5 im linken Ventrikel verglichen mit CON. Die Aldosteronantagonisten können die verminderte mRNA Expression in ALD nicht verhindern (ALD+SPI, ALD+EPL). Die mit Spironolacton und Eplerenon behandelten Kontrollgruppen (SPI, EPL) hingegen zeigen gegenüber CON unveränderte Expressionsmuster von Kv1.5. $n=8$; *** $P < 0,001$ zu CON

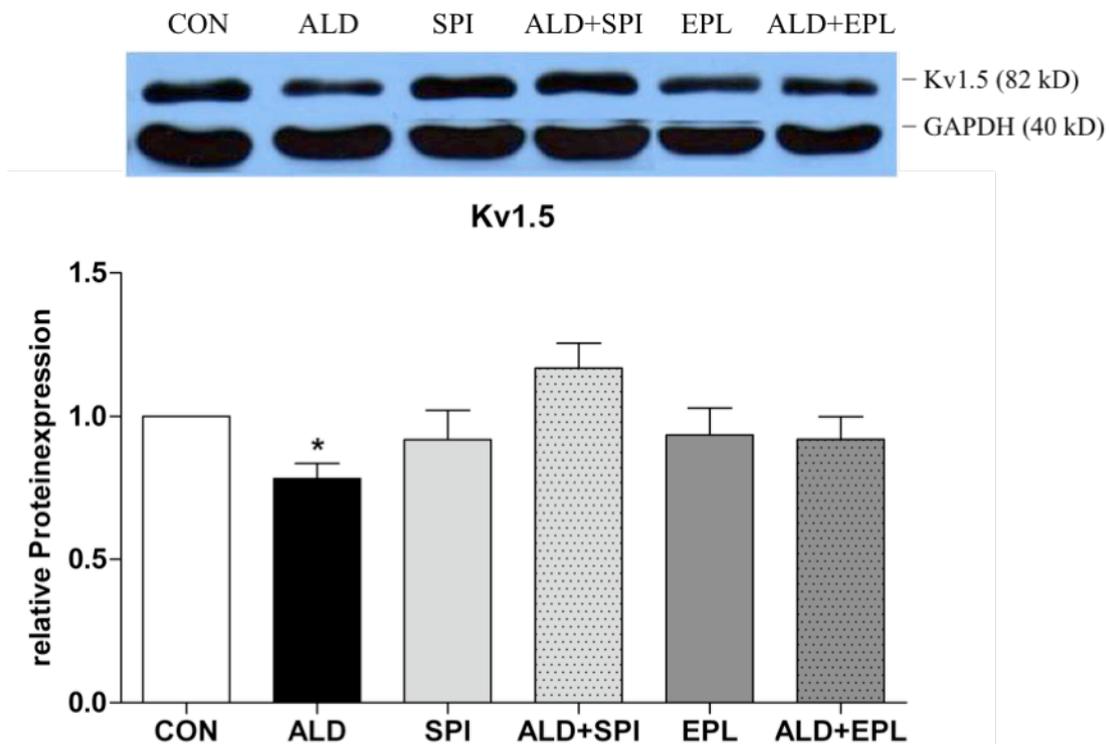


Abbildung 38: Relative Proteinexpression von Kv1.5

Western-Blot Analysen bestätigen eine signifikant erniedrigte Proteinexpression in ALD. Die Aldosteronantagonisten zeigen Expressionslevel auf Kontrollniveau. n=8; *P<0,05 zu CON

Die mRNA Expression der Untereinheit Kir2.1 des I_{K1} Stromes, der einen einwärtsgerichteten Kaliumstrom am Herzen darstellt und im Aktionspotential für die späte Repolarisationsphase und die Stabilisierung des Ruhepotentials von großer Bedeutung ist, ist in den Tieren, die Aldosteron erhielten, um mehr als 30% gegenüber der Kontrolle hochsignifikant reduziert (P<0,001 gegenüber CON) (Abbildung 39). Die Antagonisten konnten beide die erniedrigten mRNA Expressionslevel von Kir2.1 nicht auf Kontrollniveau anheben (ALD+SPI 0,78±0,06-fach und ALD+EPL 0,84±0,09-fach; P<0,05 gegenüber CON).

Kir2.2 als weitere Untereinheit des $I(K1)$ konnte im linken Ventrikel der Ratten nicht detektiert werden.

Kir2.3 dagegen zeigte ebenfalls eine signifikante mRNA Downregulation um ~40 % unter Aldosteron im Vergleich zu den Kontrolltieren (P<0,05 gegenüber CON) (Abbildung 39). Spironolacton und Eplerenon konnten diesen Aldosteron-Effekt signifikant unterbinden (ALD+SPI 0,99±0,09-fach und ALD+EPL 0,97±0,09-fach; P<0,05 zu ALD). Kontrolltiere, die Eplerenon erhielten, entwickelten eine signifikant erhöhte Kir2.3 mRNA Expression verglichen mit der CON-Gruppe (1,23±0,08-fach; P<0,05). SPI ist im Vergleich zu CON nicht verändert.

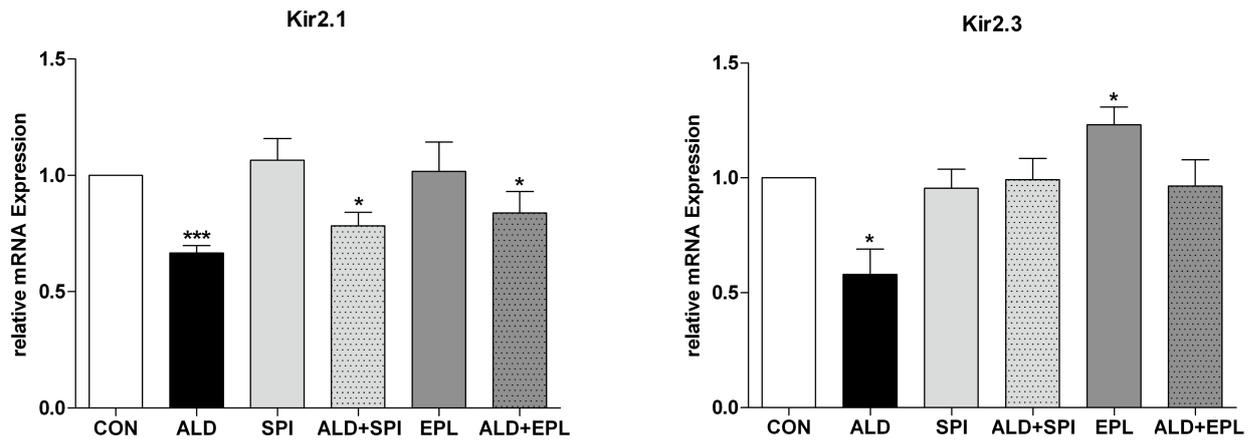


Abbildung 39: Relative mRNA Expression von Kir2.1 und Kir2.3 (I_{K1})

Die Kanaluntereinheiten Kir2.1 und Kir2.3 des I_{K1} waren auf mRNA Ebene nach vierwöchiger Aldosteronexposition in den linken Ventrikeln der Tiere signifikant niedriger exprimiert als in den Kontrolltieren. Ratten, die Aldosteron erhielten und zusätzlich mit einem Antagonisten behandelt wurden (ALD+SPI, ALD+EPL) entwickelten ebenfalls erniedrigte mRNA-Level der Kanaluntereinheit Kir2.1, nicht aber Kir2.3. Die mRNA der Kanaluntereinheit Kir2.2 konnte in den linken Ventrikeln der Tiere nicht detektiert werden.

n=8; ***P<0,001 und *P<0,05 gegenüber CON

Die Translation von Kir 2.1 ist nur tendenziell vermindert, erreicht aber keine Signifikanz.

Die Aldosteronantagonisten allein und in ALD-Tieren haben in beiden Fällen keinen Effekt auf die Proteinexpression (Abbildung 40). Auf Proteinebene zeigt Kir2.3 ebenfalls eine signifikant verminderte Expression um circa 25% in Aldosteron-exponierten Tieren ($0,75 \pm 0,04$ -fach; $P < 0,01$ gegenüber CON) (Abbildung 41).

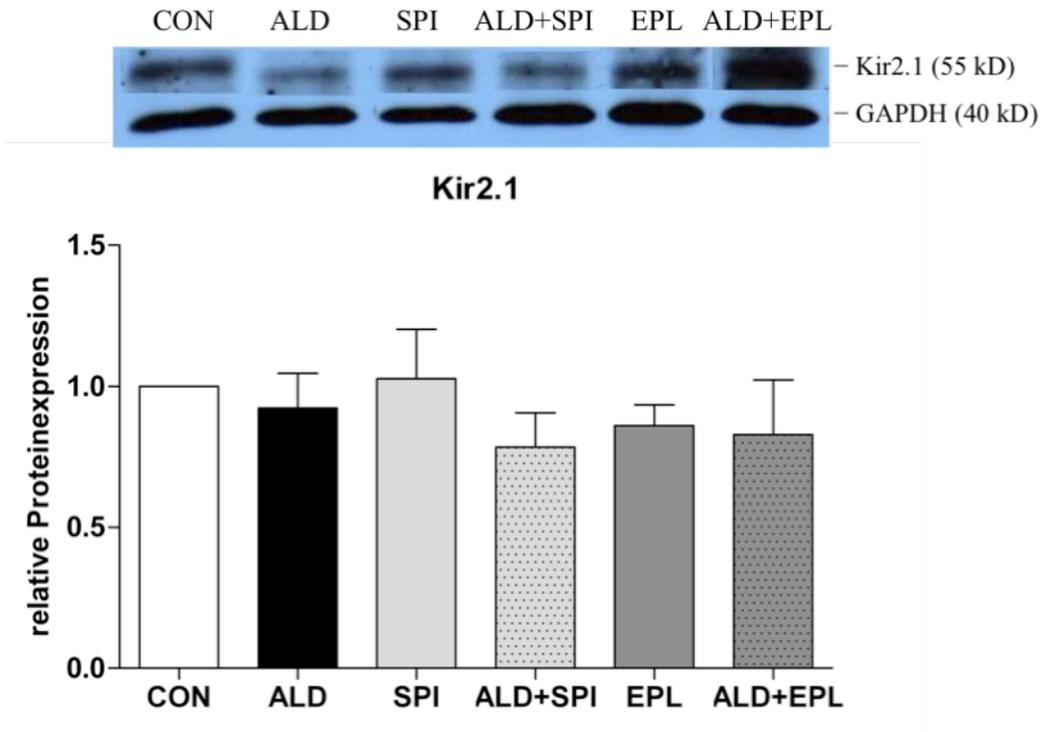


Abbildung 40: Relative Proteinexpression von Kir2.1

Western Blot Ergebnisse für Kir2.1 lieferten keine Aldosteron-induzierten signifikanten Veränderungen, hier lagen die Proteinexpressionslevel aller Gruppen auf Kontrollniveau. n=8; P>0,05

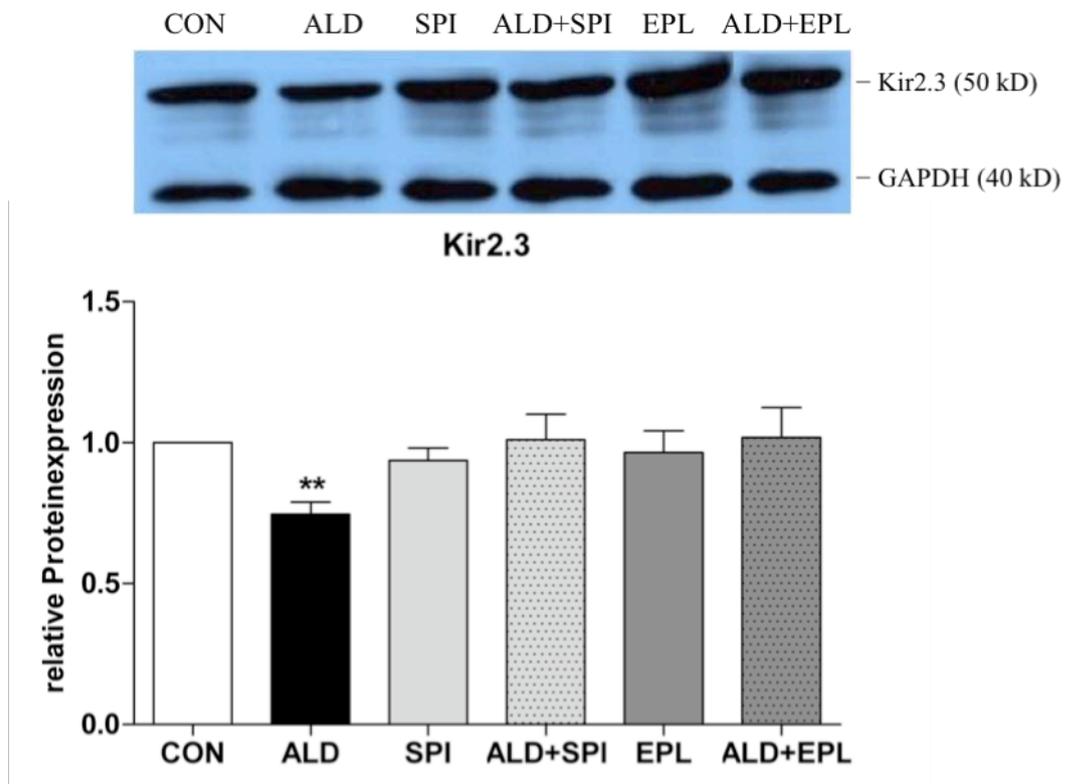


Abbildung 41: Relative Proteinexpression von Kir2.3

Unter Aldosteron kommt es zu einer signifikant erniedrigten Translation von Kir2.3. Spironolacton und Eplerenon allein und in Kombination mit Aldosteron weisen Expressionslevel auf Kontrollniveau auf. n=8; **P<0,01 gegenüber CON

Weiterhin sollte geklärt werden, inwieweit eine Aldosteronexposition in Ratten die Erregungsbildung und -weiterleitung im linken Ventrikel beeinflusst, die durch den spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanal vermittelt wird. Dazu wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene die Untereinheit $Ca_v1.2$ des Kanals auf Veränderungen untersucht. Eine chronische Aldosteronexposition resultierte in einer hochsignifikanten Abnahme der relativen mRNA Expression um circa 39% im Vergleich zu den Kontrollen ($0,61 \pm 0,06$ -fach; $P < 0,001$ gegenüber CON), die auch durch die Behandlung der Tiere mit den Aldosteronantagonisten nicht aufgehoben werden konnte (ALD+SPI $0,74 \pm 0,06$ -fach; $P < 0,01$ und ALD+EPL $0,75 \pm 0,06$ -fach; $P < 0,001$ gegenüber CON) (Abbildung 42). Auch auf Proteinebene konnte eine Aldosteron-induzierte verminderte Expression um circa 37% im Vergleich zu allen anderen Tiergruppen nachgewiesen werden ($0,63 \pm 0,13$ -fach; $P < 0,05$ gegenüber CON) (Abbildung 43). Beide Aldosteronantagonisten allein und in Kombination mit Aldosteron entwickelten keine im Vergleich zu der Kontrollgruppe veränderte Proteinexpression.

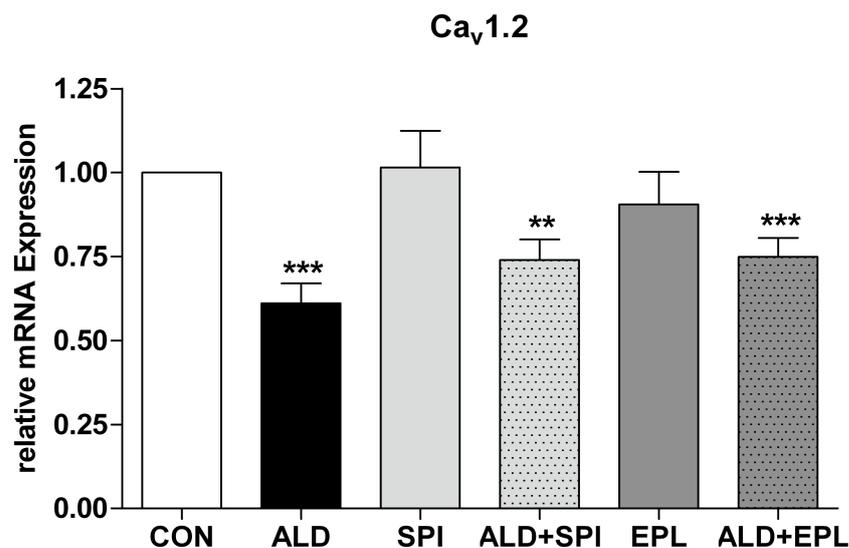
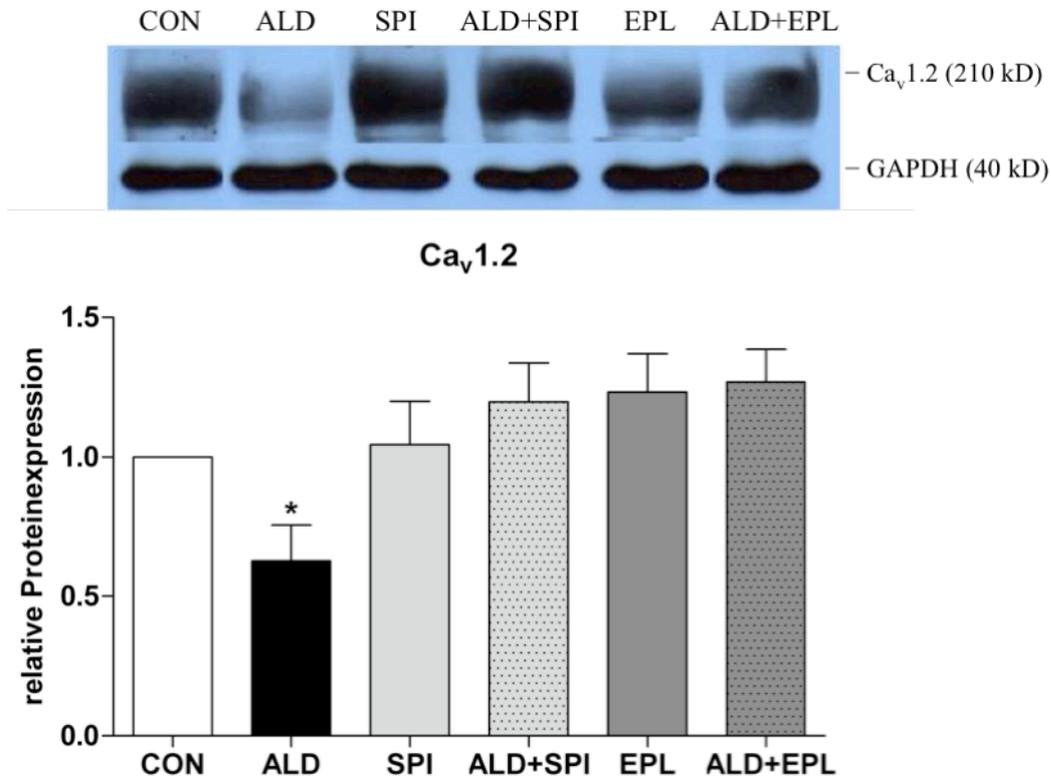


Abbildung 42: Relative mRNA Expression von Ca_v1.2

Aldosteron induzierte Auswirkung auf den spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanal führt auf mRNA -Ebene zu einer hochsignifikant erniedrigten Expression der Kanaluntereinheit Ca_v1.2 in der ALD-Gruppe im Vergleich zu CON, die durch die Aldosteronantagonisten nicht verhindert werden konnte. n=8; ***P<0,001, **P<0,01 gegenüber CON

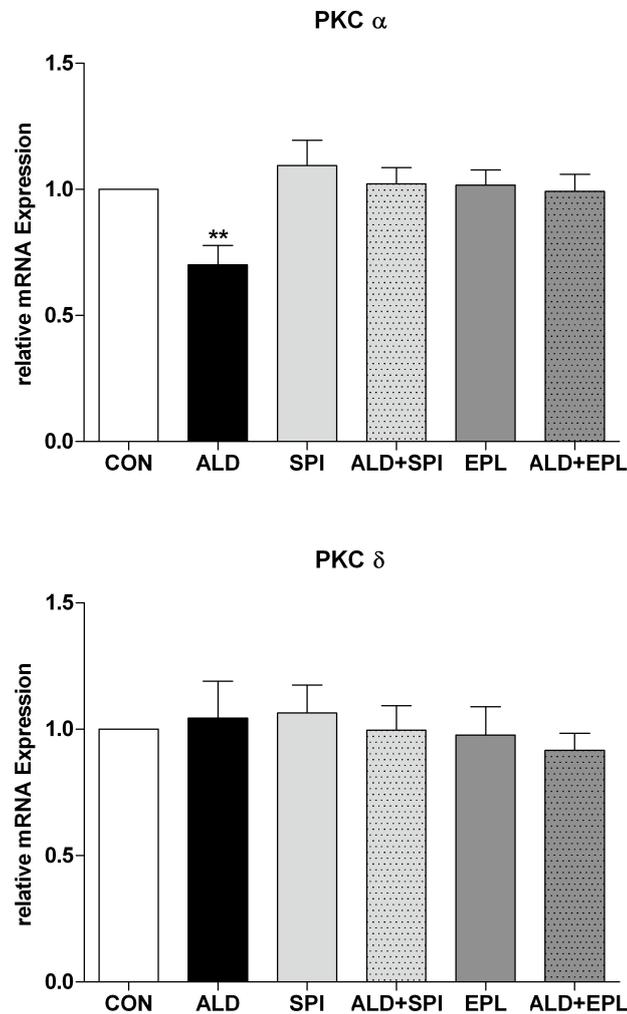
**Abbildung 43: Relative Proteinexpression von Ca_v1.2**

Die Proteinexpression von Ca_v1.2 ist ebenfalls in linksventrikulärem Gewebe Aldosteron exponierter Ratten signifikant erniedrigt, Spironolacton und Eplerenon behandelte ALD-Tiere zeigen Expressionslevel auf Kontrollniveau. n=4; *P<0,05

4.8 PKC- und Calcineurin-Signaltransduktion

PKC spielt bei der Ausbildung der kardialen Hypertrophie eine bedeutende Rolle und wurde im Rahmen dieser Arbeit auf mRNA Ebene untersucht, um eine Beeinflussung der Expression der Untereinheiten durch Aldosteron zu untersuchen. Dazu wurde die Genregulation der im Herzen vorhandenen Untereinheiten PKC- α , PKC- δ und PKC- ϵ in linksventrikulärem Gewebe mittels Realtime-PCR bestimmt (Abbildung 44). Die Verabreichung von Aldosteron führt bei den Ratten zu einer signifikant verminderten Genexpression von PKC- α um 30% im Vergleich zu CON (0,70 \pm 0,08-fach; P<0,01).

Aldosteron und die MR-Antagonisten haben keinen Einfluss auf die PKC- δ mRNA-Expression (ALD: $1,04 \pm 0,14$ -fach, SPI: $1,07 \pm 0,11$ -fach, EPL: $0,98 \pm 0,11$ -fach). Die mRNA Expressionslevel von PKC- ϵ sind unter chronischem Aldosteroneinfluss signifikant geringer exprimiert als in den Kontrolltieren ($0,74 \pm 0,05$ -fach; $P < 0,01$). Sowohl Spironolacton als auch Eplerenon sind in der Lage, die Aldosteron verursachte Downregulation der mRNA-Level von PKC- α und PKC- ϵ signifikant zu hemmen (PKC- α : ALD+SPI $0,99 \pm 0,09$ -fach und ALD+EPL $0,92 \pm 0,07$ -fach; PKC- ϵ : ALD+SPI $0,94 \pm 0,04$ -fach und ALD+EPL $1,02 \pm 0,08$ -fach).



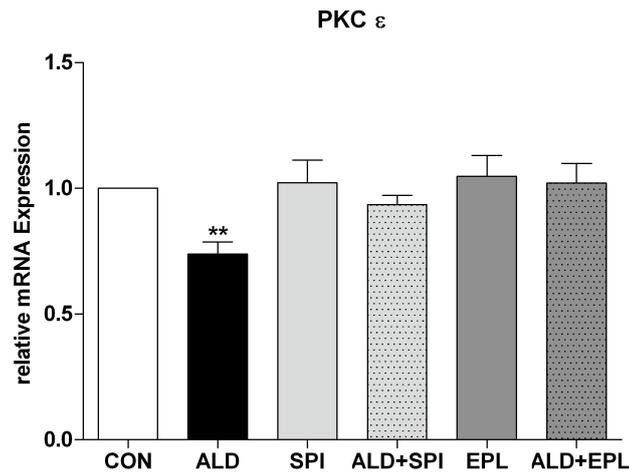


Abbildung 44: Relative mRNA Expression der kardialen PKC Isoformen in linksventrikulärem Gewebe
 Die Auswertung der Realtime-PCR der im linken Ventrikel vorhandenen PKC-Untereinheiten führt zu einer signifikant erniedrigten mRNA Expression in ALD von PKC- α und PKC- ϵ im Vergleich zu CON. Die mRNA Konzentrationen von PKC- δ werden durch Aldosteron nicht beeinflusst. Spironolacton und Eplerenon verhindern die Aldosteron-induzierte Downregulation der mRNA von PKC- α und PKC- ϵ . n=8; **P<0,01 gegenüber CON

Auch Calcineurin scheint bei der Ausbildung einer kardialen Hypertrophie beteiligt zu sein und in dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob erhöhte Aldosteron-Konzentrationen die zelluläre Calcineurin Phosphatase Aktivität (PP2B) sowie die mRNA Expression der aktiven Untereinheit A β (PPP3CB) beeinflussen. Die Ergebnisse zeigen, dass die mRNA Expression von Calcineurin A β bei den ALD-Tieren signifikant erniedrigt vorliegt ($0,78 \pm 0,06$ -fach in ALD; P<0,01 gegenüber CON) (Abbildung 45). Die Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon konnten die durch Aldosteron induzierte Abnahme der mRNA Expression signifikant inhibieren (ALD+SPI $0,90 \pm 0,04$ -fach and ALD+EPL $0,93 \pm 0,05$ -fach, P<0,05 gegenüber ALD).

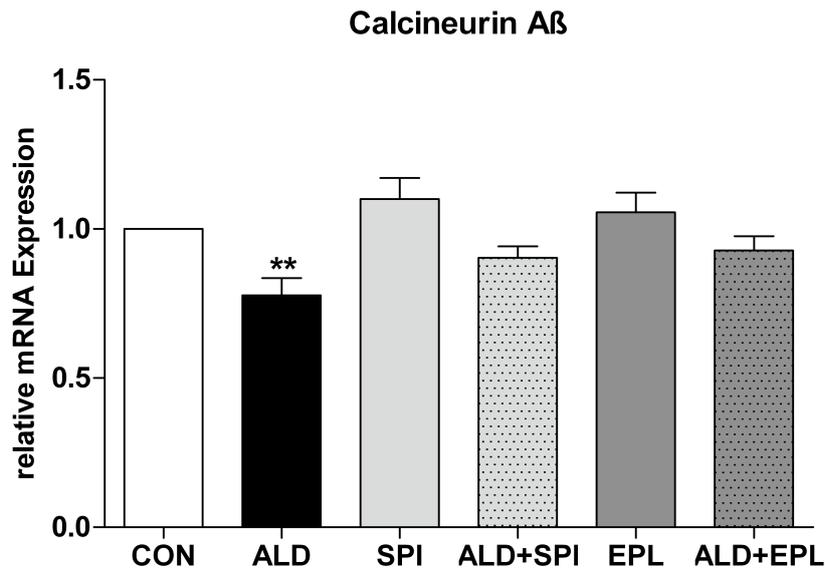


Abbildung 45: Relative mRNA Expression von Calcineurin A β (PPP3CB)

Die mRNA Expression der aktiven Untereinheit A β von Calcineurin ist in Realtime-PCR Experimenten im linken Ventrikel der Aldosteron-exponierten Tiere hochsignifikant gegenüber CON erniedrigt. ALD+SPI und ALD+EPL verhindern diesen Aldostereffekt und haben im Vergleich zu der Kontrollgruppe keine signifikant veränderten mRNA-Level. n=8; **P<0,01 zu CON

Die Ergebnisse weisen ferner darauf hin, dass eine vierwöchige Aldosteronstimulation in linksventrikulärem Gewebe der Ratten zu einer signifikant erniedrigten absoluten Calcineurinaktivität führt (ALD: $0,28 \pm 0,08$ nmol freigesetztes Phosphat gegenüber CON: $0,47 \pm 0,05$ nmol freigesetztes Phosphat; $P < 0,05$) (Abbildung 46+47). Die beiden Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon, die den Kontrolltieren verabreicht wurden, haben keinen Effekt auf die Calcineurinaktivität (SPI: $0,37 \pm 0,12$ nmol freigesetztes Phosphat, EPL: $0,46 \pm 0,05$ nmol freigesetztes Phosphat), waren jedoch nicht in der Lage, die Aktivitätsabnahme in Aldosteron-exponierten Tieren zu unterbinden (ALD+SPI $0,32 \pm 0,03$ nmol freigesetztes Phosphat und ALD+EPL $0,20 \pm 0,02$ nmol freigesetztes Phosphat; $P > 0,05$ zu ALD).

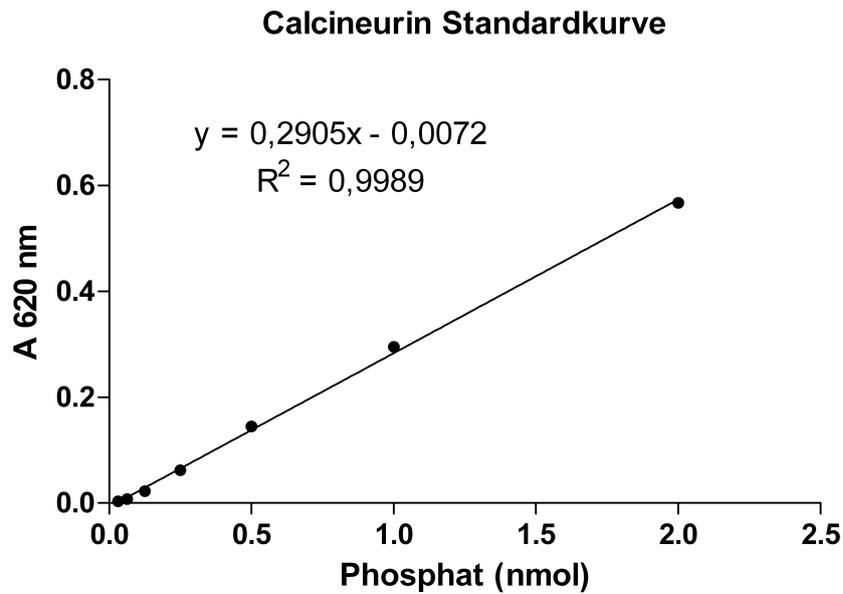


Abbildung 46: Bestimmung der Calcineurin-Phosphatase Aktivität

Auswertung der Standardkurve zur Bestimmung der Calcineurin-Phosphatase Aktivität in linksventrikulärem Gewebe der Ratte. Die freigesetzte Phosphatmenge (nmol) ist proportional zu der gemessenen Extinktion bei 620 nm und kann aus der Standardkurve ermittelt werden.

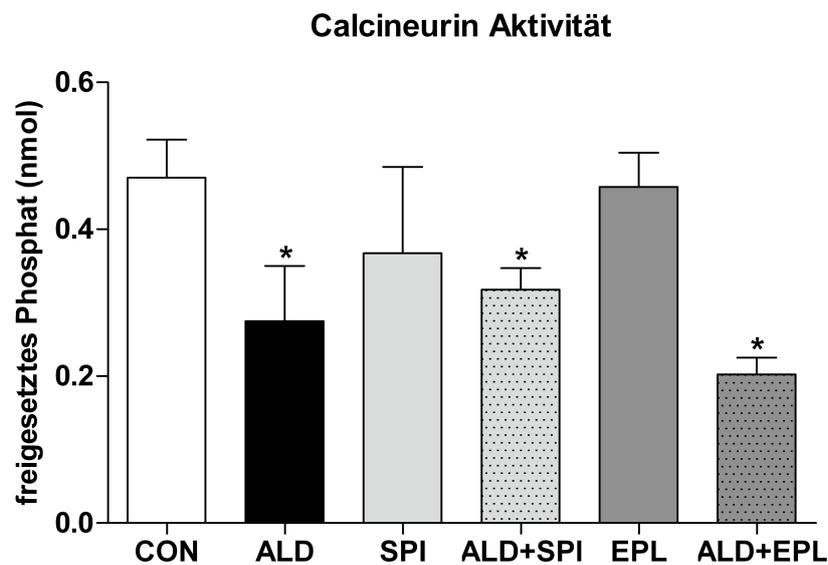


Abbildung 47: Absolute Calcineurin-Phosphatase Aktivität

Die Auswertung der Calcineurin-Aktivität in linksventrikulärem Gewebe resultiert in einer signifikanten Aktivitätsabnahme in ALD, ALD+SPI und ALD+EPL. Die Aldosteronantagonisten allein beeinflussen die Calcineurinaktivität nicht und weisen Werte auf Kontrollniveau auf. n=4; $P < 0,05$ gegenüber CON

5. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass eine chronische Aldosteronexposition *in vivo* zu der Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie führt, die sich unter den verwendeten Bedingungen unabhängig von einer Hypertonie entwickelt. Dies konnte anhand des signifikant erhöhten Herzgewichtes der Aldosteron-Tiere, durch eine signifikant erhöhte Transkription des ANP in linksventrikulärem Gewebe und durch eine im MKG detektierte erhöhte R-Amplitude belegt werden. Zusätzlich kommt es zu elektrophysiologischen Veränderungen, die im MKG und im EKG gezeigt werden konnten, wie zu einer verlängerten QT-Zeit, der Ausbildung von ventrikulären Extrasystolen und nicht anhaltenden ventrikulären Tachykardien. Auch die Expression und Translation repolarisierender K^+ -Kanäle und des L-Typ Ca^{2+} -Kanals in linksventrikulärem Gewebe sind unter Aldosteroneinfluss verändert. Der unspezifische Aldosteronantagonist Spironolacton und der spezifische Aldosteronantagonist Eplerenon sind in der Lage, die Aldosteron-induzierten Veränderungen größtenteils und in gleicher Weise zu verhindern. Dies spricht dafür, dass der kardiale MR eine dominierende Rolle bei den durch Aldosteron bedingten Veränderungen spielt. Die Antagonisten selbst verändern die elektrophysiologischen Bedingungen im Herzen nicht.

Viele Tiermodelle zeigen, dass Aldosteron zusammen mit einer erhöhten Salzzufuhr und nach Entfernen einer Niere den Blutdruck signifikant erhöht und ein Remodeling des Herzens verursacht (Rocha et al. 2002; Sun et al. 2002; Brilla and Weber 1992; Robert et al. 1995). In dieser Arbeit konnte dagegen gezeigt werden, dass die alleinige Gabe von Aldosteron in der verwendeten Dosis keine erhöhten Blutdruckwerte hervorruft, jedoch kardiales Remodeling induziert. Dieses Ergebnis wird durch eine aktuelle Studie unterstützt, in der ein ähnliches Rattenmodell mit Aldosteronüberladung nur leicht erhöhte Blutdruckwerte aufweist (Yoshida et al. 2005). Der hier gewählte Versuchsansatz erlaubt es zwischen indirektem blutdruck-

vermittelten kardialen Remodeling und direkten Aldosteron Effekten im Herzen zu differenzieren.

Der durch chronische Aldosteronstimulation resultierende kardiale Phänotyp mit QT-Zeit Verlängerung, einem verzögerten $T_{\text{Peak}}-T_{\text{End}}$ -Intervall, dem vermehrten Auftreten ventrikulärer Extrasystolen sowie nicht-anhaltenden ventrikulären Tachyarrhythmien deckt sich mit den Beobachtungen bei Patienten mit myokardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz (Schouten et al. 1991; Zabel et al. 1995). Unter einer Therapie mit Spironolacton kommt es zu einer Verbesserung der QT-Zeit Dispersion, der Herzfrequenzvariabilität, und zu einer Reduktion des Auftretens von ventrikulären Extrasystolen und ventrikulären Tachykardien (MacFadyen et al. 1997; Barr et al. 1995; Ramirez et al. 2000). Die hier ermittelten Daten lassen vermuten, dass ähnliche klinische Ergebnisse von dem spezifischen Aldosteronantagonisten Eplerenon erwartet werden können. Das QT-Intervall ist nach vierwöchiger Aldosteronstimulation im Vergleich zu dem der Kontrolle signifikant verlängert, was auf das signifikant verzögerte $T_{\text{Peak}}-T_{\text{End}}$ -Intervall zurückzuführen ist. Eine QT-Zeit Verlängerung begünstigt das Auftreten von ventrikulären Rhythmusstörungen und erhöht das Risiko für den plötzlichen Herztod.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Suppression des I_{K1} -Stromes in transgenen Mäusen zu einer Verlängerung der QRS- und QT-Zeit führt (McLerie and Lopatin 2003; Miake et al. 2003). Auch wird über einen Zusammenhang zwischen dem I_{K1} und dem Auftreten ventrikulärer Arrhythmien berichtet (Dhamoon and Jalife 2005). Daher scheint es möglich, dass die erniedrigte Expression von Kir2.1 sowie Kir2.3 in dieser Arbeit den Phänotyp mit verursacht. In einer Studie mit transgenen Mäusen, in denen es zu einer kardiospezifischen Überproduktion von Angiotensin II kommt, entwickeln die Tiere blutdruckunabhängig eine Hypertrophie, ventrikuläre Arrhythmien und eine QT-Zeit Verlängerung, einhergehend mit einem erniedrigten I_{K1} Strom sowie einer verminderten mRNA-Expression von Kir2.1 und Kir2.2 (Domenighetti et al. 2007). In dieser Arbeit sind beide Untereinheiten des I_{K1} , Kir2.1

und Kir2.3, die im linken Ventrikel detektiert werden konnten, auf mRNA Ebene signifikant niedriger exprimiert und in Western Blot Experimenten konnte dies für die Kanaluntereinheit Kir2.3 bestätigt werden. In einem weiteren Tiermodell kam es unter Suppression des I_{K1} -Stromes in Meerschweinchen zu vermehrt auftretenden ventrikulären Extrasystolen. Dieser Effekt konnte in über 40% der Tiere detektiert werden (Miake et al. 2003). Auch in EKG-Aufzeichnungen der Aldosteron-exponierten Tiere kommt es zu einem häufigeren Auftreten ventrikulärer Extrasystolen. Es ist weiterhin wahrscheinlich, dass die erniedrigt exprimierten Kanaluntereinheiten des I_{K1} die Verlängerung des T_{Peak} - T_{End} -Intervalls in den MKG-Messungen und somit eine verzögerte Repolarisation induzieren, da dieser K^+ -Kanal im Aktionspotential für die Repolarisationsphase und das Ruhepotential verantwortlich ist. So konnte in einer Studie mit einem transgenen Mausmodell mit einer Überexpression von I_{K1} gezeigt werden, dass der langsame Abschnitt der T-Welle fast vollständig fehlt, was in diesem Fall zu einem verkürzten QT-Intervall führte (Li et al. 2004).

Der MR bindet Mineralkortikoide und Glukokortikoide mit gleicher Affinität (Arriza et al. 1987; Lombes et al. 1994). Die Konzentration der zirkulierenden Glukokortikoide ist allerdings 100fach höher als die von Aldosteron. Da die 11 β -HSD 2-Expression im Herzen vernachlässigbar gering ist (Nagata et al. 2006), wird spekuliert, dass der kardiale MR eher mit Cortison (Corticosteron in Nagetieren) als mit Aldosteron besetzt ist (Funder 2005; Gomez-Sanchez et al. 2004; Nagata et al. 2006). Weiterhin gibt es Hinweise, dass einige Aldosteronwirkungen über den Glukokortikoidrezeptor vermittelt werden (Schulz-Baldes et al. 2001). In dem hier verwendeten Modell sind jedoch beide Aldosteronantagonisten Spironolacton (unspezifisch) und Eplerenon (spezifisch) in der Lage, das durch Aldosteron induzierte kardiale Remodeling in gleicher Weise zu verhindern, was für einen MR vermittelten Effekt spricht, während der GR hier nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Die Reduktion des plötzlichen Herztodes bei Patienten mit Herzinsuffizienz nach Therapie mit Aldosteronantagonisten (RALES und EPHEBUS Studien) ist vermutlich durch zwei Hauptmechanismen zu erklären; zum einen durch Veränderung der K^+ -Exkretion in der Niere und zum anderen durch Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Kardiomyozyten. In dieser Arbeit kommt es unter Aldosteron dagegen zu keinen signifikant erniedrigten K^+ -Spiegeln, so dass primär die Veränderungen der Expression kardiospezifischer K^+ -Kanäle und des L-Typ Ca^{2+} -Kanals für die Ausbildung des elektrischen Remodeling verantwortlich zu sein scheinen. Dieses Ergebnis schließt aber nicht aus, dass die Hypokaliämie eine Rolle bei der Ausbildung des plötzlichen Herztodes bei Herzinsuffizienz-Patienten spielt, allerdings unterstreicht es die Rolle der Veränderungen auf Ebene der Kardiomyozyten.

Eine verminderte Kaliumstromdichte (I_{K1} , I_{to}) im Herzen erhöht das Risiko für das Auftreten von plötzlichem Herztod (Ravens and Cerbai 2008). Herzinsuffizienz, kardiale Hypertrophie und Ischämie werden mit einem verlängerten Aktionspotential assoziiert, das partiell durch eine Downregulation des I_{to} verursacht wird (Pinto and Boyden 1999; Tomaselli and Marban 1999; Oudit et al. 2001). Kv4.3 mRNA (I_{to}) ist bei herzinsuffizienten Patienten erniedrigt exprimiert (Kaab et al. 1998b). Kv1.5 Transkripte (I_{Kur}) sind in hypertensiven Ratten, die eine ventrikuläre Hypertrophie entwickeln, erniedrigt exprimiert (Matsubara et al. 1993) wie auch im ventrikulären Epikard von Hunden nach Herzinfarkt (Pinto and Boyden 1999).

In diesem Experiment konnten Veränderungen in der mRNA Expression aller untersuchten K^+ -Kanäle (Kv4.2 und Kv4.3 (I_{to}), Kv1.5 (I_{Kur}), Kir2.1 und Kir2.3 (I_{K1})) sowie von $Ca_v1.2$, der Untereinheit des L-Typ Calciumkanals, in den linken Ventrikeln aldosteron-exponierter Ratten nachgewiesen werden. In Western-Blot Experimenten dagegen konnten nur Veränderungen der Proteinexpression von Kv1.5, Kir2.3 und $Ca_v1.2$ detektiert werden. Die übrigen Kanaluntereinheiten (Kv4.2 und Kv4.3, Kir2.1) zeigen lediglich einen Trend zu einer verringerten Proteinexpression, die allerdings keine statistische Signifikanz erreicht.

Aldosteron aber auch die bedingte Überexpression des MR führen zu einem Remodeling bestimmter Ionenkanäle. So wurde von einer Abnahme des transienten auswärtsgerichteten K^+ -Stroms I_{to} und von einer Zunahme des L-Typ Ca^{2+} -Stroms I_{Ca} berichtet (Benitah and Vassort 1999; Benitah et al. 2001; Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Auch kommt es nach Reduktion des I_{to} Stromes in Mäusen zu einem erhöhten Calciumstrom über $I_{Ca,L}$ sowie zu einer Aktivierung von Calcineurin (Sah et al. 2002).

Der Einfluß von Aldosteron auf die K^+ -Ströme, die für die späte Repolarisation im Aktionspotential verantwortlich sind (I_{K1} und I_{Kur}) ist nicht bekannt und während Veränderungen der Stromdichte einzelner K^+ -Kanäle beschrieben wurden, gibt es keine Daten zu der mRNA- und Proteinexpression dieser Kanäle. Die mRNA Expression von Kv4.2 und Kv4.3 (I_{to}) ist unter Aldosteron im linken Ventrikel der Tiere signifikant erniedrigt. Beide Aldosteronantagonisten können diese Veränderungen in der mRNA Expression in gleicher Weise verhindern. Die Proteinexpression der Kanaluntereinheiten ist nur tendenziell erniedrigt, ohne statistische Signifikanz zu erreichen, was mit einer unzureichenden Aldosteronstimulation in diesem Tiermodell zusammenhängen könnte oder mit einer Regulierung der Kanalfunktion, die für eine reduzierte Stromdichte verantwortlich sein könnte (Benitah et al. 2001; Ouvrard-Pascaud et al. 2005).

Kv1.5 (I_{Kur}) ist sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene unter Aldosteron signifikant erniedrigt und hier waren die Aldosteronantagonisten in der Lage, die erniedrigte Proteinexpression unter Aldosteron zu verhindern. Hypertensive Ratten entwickeln eine kardiale Hypertrophie und eine Abnahme der Kv1.5 mRNA Expression in den Ventrikeln (Matsubara et al. 1993). In einem transgenen Mausmodell mit einem spezifischen *knock-down* von Kv1.5 kommt es zu einer signifikanten QT-Zeit Verlängerung (London et al. 1998). Die QT-Zeit Verlängerung unter Aldosteronstimulation in diesem Versuch könnte durch eine reduzierte Stromdichte des I_{Kur} verursacht werden, die aus der verringerten Konzentration der Kanaluntereinheit resultiert. Die signifikant erniedrigte mRNA Expression von Kv1.5 unter

Aldosteronstimulation konnte sowohl durch Spironolacton als auch durch Eplerenon nicht aufgehoben werden. Hier könnten andere Signaltransduktionswege eine Rolle spielen und die Regulation über PKC könnte einen dieser Mechanismen darstellen, da Kv1.5 eine Phosphorylierungsstelle für PKC aufweist.

Die $Ca_v1.2$ Untereinheit des L-Typ Ca^{2+} -Kanals ist ebenfalls auf mRNA- und Proteinebene in Aldosteron exponierten Tieren vermindert exprimiert. Die reduzierte Proteinexpression konnte durch Spironolacton und Eplerenon unterdrückt werden. Dieser Befund ist im Vergleich zu anderen Studien neu, in denen von einer Zunahme des I_{Ca} berichtet wird (Benitah and Vassort 1999; Benitah et al. 2001; Ouvrard-Pascaud et al. 2005). Der beschriebene Anstieg der Calciumstromdichte könnte durch eine funktionelle Regulation des Kanals begründet sein, so dass die hier reduzierte Proteinexpression die Konsequenz einer kompensatorischen Gegenregulation darstellen könnte. Andererseits könnte die Regulation des Ca^{2+} -Kanals auch zeitabhängig erfolgen, denn in einer *in-vitro* Studie (Benitah and Vassort 1999) wird ein akuter Aldosteron-Effekt untersucht, der zu einer erhöhten Funktion und Expression von $I_{Ca,L}$ führt, während nach Langzeitstimulation eine reduzierte Expression und Funktion des Ca^{2+} -Kanals resultieren könnte. Weiterhin wird von einem direkten Einfluß von I_{Ca} und I_K Strömen durch I_{to} berichtet (Wang et al. 2006). In einer aktuellen Studie wurde die Interaktion zwischen Calcineurin und $Ca_v1.2$ untersucht und dabei kam es nach akuter Inhibierung von Calcineurin zu einem verminderten $I_{Ca,L}$ Strom (Tandan et al. 2009). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es zu einer direkten Interaktion zwischen Calcineurin und dem L-Typ Ca^{2+} -Kanal bei elektrischem Remodeling im Herzen kommt.

Um einen Einblick in die intrazellulären Signaltransduktionswege zu erhalten, die den Aldosteron vermittelten Veränderungen zugrunde liegen könnten, wurde die Expression der kardialen PKC Isoformen sowie die Expression und Aktivität von Calcineurin untersucht, da beide Signaltransduktionswege in Studien mit Aldosteron in Zusammenhang gebracht wurden (Christ et al. 1995; Mihailidou et al. 2004; Takeda et al. 2002b; Mano et al. 2004; Okoshi et

al. 2004). Darüber hinaus wurde berichtet, dass nach Überexpression von Calcineurin ein Anstieg des kardialen I_{to} detektiert wurde, der über eine erhöhte Transkription der Kv4.2 Kanaluntereinheit vermittelt wird (Gong et al. 2006). Die vorliegenden Studien über einen Einfluss von Aldosteron auf die PKC Isoformen untersuchten überwiegend akute und nicht-genomisch vermittelte Effekte, während die Effekte durch chronische Aldosteronstimulation nicht bekannt sind. Zwei Untereinheiten der PKC wurden beschrieben, die nach Aldosteronstimulation aktiviert werden. In neonatalen Rattenkardiomyozyten kam es zu einer Aktivierung der PKC- α Untereinheit unter Aldosteron (Christ et al. 1995; Okoshi et al. 2004), wohingegen PKC- ε eine Rolle bei den Aldosteron vermittelten Effekten in Kardiomyozyten des Kaninchens spielt (Mihailidou et al. 2004). Im Gegensatz dazu kommt es unter akuter Aldosteronstimulation zu einer Abnahme der PKC Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte (Sato et al. 1997). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter chronischer Aldosteronexposition in Ratten zu einer reduzierten mRNA Expression von PKC- α und PKC- ε kommt, wohingegen die PKC- δ Expressionslevel unverändert sind. Diese Effekte scheinen MR vermittelt zu sein, da beide Aldosteronantagonisten in der Lage sind, die unter Aldosteron auftretenden Veränderungen zu verhindern. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es im Gegensatz zu einer kurzzeitigen Aldosteronstimulation bei einer Langzeitexposition zu einer reduzierten Aktivität von PKC- α und PKC- ε vermittelten Signaltransduktionswegen kommt.

Die mRNA Expression von Calcineurin A β (PPP3CB) sowie die Calcineurinaktivität sind im linken Ventrikel der Aldosteron exponierten Ratten signifikant erniedrigt. Sowohl Spironolacton als auch Eplerenon sind nicht in der Lage, die reduzierte Calcineurinaktivität zu verhindern. Dagegen können beide Antagonisten die verminderte Expression von Calcineurin A β inhibieren. Dieser Effekt lässt vermuten, dass der Calcineurin Signaltransduktionsweg unabhängig von dem MR reguliert wird. In einer früheren Tierstudie mit Aldosteron wurde eine erhöhte Calcineurin Aktivität berichtet (Takeda et al. 2002a). Das verwendete Tiermodell

ist allerdings mit dem in dieser Arbeit verwendeten Modell nicht vergleichbar. Es wurden einseitig nephrektomierte Ratten verwendet, die eine signifikante Hypertonie nach Behandlung mit Aldosteron entwickelten, während in diesem Experiment keine Hypertonie bei den Tieren auftrat.

Insgesamt konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine chronische Aldosteronstimulation elektrophysiologische und strukturelle Veränderungen unabhängig von Blutdruckänderungen induziert. Die Aldosteronantagonisten Spironolacton (unspezifisch) und Eplerenon (spezifisch) konnten die auftretenden Veränderungen inhibieren. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das durch die Aldosteronantagonisten begünstigte, verringerte Auftreten von plötzlichem Herztod in den beiden großen klinischen Studien RALES und EPHEBUS zumindest zum Teil durch die Prävention der veränderten Expression der repolarisierenden K^+ -Kanäle und des L-Typ Ca^{2+} -Kanals begründet werden kann.

6. Zusammenfassung

Das Auftreten von plötzlichem Herztod, das häufig durch ventrikuläre Tachyarrhythmien ausgelöst wird, stellt bis heute eine Herausforderung bei der Therapie der Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz dar. Derartige Arrhythmien werden bei über 85% der Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz beschrieben und über 50% der Todesursachen werden dabei auf das Auftreten von plötzlichem Herztod zurückgeführt. Es wird vermutet, dass das elektrische Remodeling als Teil der gesamten kardialen Umbauvorgänge bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz die pathophysiologische Grundlage dieser Arrhythmien darstellt. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System spielt eine zentrale Rolle bei der Ausbildung des elektrischen Remodeling und insbesondere erhöhte Aldosteronkonzentrationen korrelieren mit dem Risiko kardiovaskulärer Zwischenfälle. Darüberhinaus konnte in zwei klinischen Studien (RALES und EPHEsus) gezeigt werden, dass die Therapie herzinsuffizienter Patienten mit den Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon die Mortalität und Morbidität und insbesondere auch das Auftreten von plötzlichem Herztod signifikant senken konnte. Weitere Studien zeigen eine Verbindung zwischen dem Auftreten einer Herzinsuffizienz und Veränderungen in der Funktion und Expression kardiospezifischer repolarisierender K^+ -Kanäle. Neben den klinischen Daten, die einen protektiven Effekt der Aldosteronantagonisten bei plötzlichem Herztod belegen, ist wenig über die Auswirkungen von Aldosteron auf das elektrische Remodeling des Herzens bekannt.

In dieser Arbeit sollte daher die Auswirkung einer chronischen Aldosteronexposition in Ratten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens untersucht werden. Dazu wurde Wistar-Ratten Aldosteron verabreicht und einigen Tieren die Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon, um die Effekte der unspezifischen (Spironolacton) und spezifischen (Eplerenon) MR Blockade auf die elektrischen Eigenschaften der Kardiomyozyten zu untersuchen.

Die Aldosteron exponierten Tiere entwickelten eine linksventrikuläre Hypertrophie, die sich unabhängig von Blutdruckveränderungen entwickelte, sowie ein signifikant verlängertes QT-Intervall, vermehrt auftretende ventrikuläre Extrasystolen und ventrikuläre Tachykardien. Die Elektrolytwerte (K^+ , Na^+ , Cl^-) waren dabei nicht verändert. Die Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon waren in der Lage, die unter Aldosteron auftretenden Veränderungen zu verhindern. Die Transkription der Untereinheiten kardiospezifischer K^+ -Kanäle (I_{to} , I_{Kur} , I_{K1}) und des L-Typ Ca^{2+} -Kanals war unter Aldosteronstimulation im linken Ventrikel signifikant erniedrigt. Auf Proteinebene konnte dies für die Kanaluntereinheiten $Kv1.5$ (I_{Kur}), $Kir2.3$ (I_{K1}) und $Ca_v1.2$ (L-Typ Ca^{2+} -Kanal) bestätigt werden. Die Untersuchung eventuell zugrunde liegender Signaltransduktionswege lieferte erniedrigte mRNA Expressionslevel der kardiospezifischen Proteinkinase C Isoformen PKC- α und PKC- ϵ , wohingegen die mRNA-Expression von PKC- δ unter Aldosteronstimulation unverändert war. Diese Veränderungen in der Transkription der PKC Isoformen wurden durch Behandlung der Tiere mit den Aldosteronantagonisten inhibiert, was für einen MR vermittelten Effekt spricht. Weiterhin zeigte eine chronische Aldosteronstimulation eine erniedrigte mRNA Expression von Calcineurin A β (PPP3CB) sowie Calcineurinaktivität in linksventrikulärem Gewebe der Tiere. Dieser Effekt konnte durch die Aldosteronantagonisten nicht aufgehoben werden, so dass ein Signaltransduktionsweg, der nicht über den MR vermittelt wird, zugrunde liegen könnte.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass chronisch erhöhte Aldosteronkonzentrationen im Rattenherz blutdruckunabhängig zu strukturellen und elektrischen Veränderungen führen, die das Auftreten maligner ventrikulärer Arrhythmien begünstigen. Beide Aldosteronantagonisten Spironolacton und Eplerenon sind in der Lage, die durch Aldosteron vermittelten Effekte in gleicher Weise zu inhibieren.

Die Ergebnisse zeigen pathophysiologische Zusammenhänge auf, die die Bedeutung von Aldosteron und der Therapie mit Aldosteronantagonisten für die Behandlung der Herzinsuffizienz und in Zukunft möglicherweise der Hypertrophie unterstreichen.

7. Literatur

- Abildstrom, S. Z., Torp-Pedersen, C., and Kober, L. (2002). "Arrhythmic and sudden death in chronic ischemic heart disease--a review of epidemiological data." *Card Electrophysiol. Rev.*, 6(1-2), 5-8.
- Aiba, T., and Tomaselli, G. F. (2010). "Electrical remodeling in the failing heart." *Curr. Opin. Cardiol.*, 25(1), 29-36.
- Anumonwo, J. M., and Lopatin, A. N. (2010). "Cardiac strong inward rectifier potassium channels." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 48(1), 45-54.
- Armoundas, A. A., Wu, R., Juang, G., Marban, E., and Tomaselli, G. F. (2001). "Electrical and structural remodeling of the failing ventricle." *Pharmacol. Ther.*, 92(2-3), 213-230.
- Arora, R. B., and Somani, P. (1962). "Ectopic arrhythmia provoking action of aldosterone." *Life Sci.*, 5, 215-218.
- Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E., and Evans, R. M. (1987). "Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor." *Science*, 237(4812), 268-275.
- Barr, C. S., Lang, C. C., Hanson, J., Arnott, M., Kennedy, N., and Struthers, A. D. (1995). "Effects of adding spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease." *Am. J. Cardiol.*, 76(17), 1259-1265.

- Benitah, J. P., Perrier, E., Gomez, A. M., and Vassort, G. (2001). "Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes." *J. Physiol.*, 537(Pt 1), 151-160.
- Benitah, J. P., and Vassort, G. (1999). "Aldosterone upregulates Ca²⁺ current in adult rat cardiomyocytes." *Circ. Res.*, 85(12), 1139-1145.
- Berger, S., Bleich, M., Schmid, W., Cole, T. J., Peters, J., Watanabe, H., Kriz, W., Warth, R., Greger, R., and Schutz, G. (1998). "Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(16), 9424-9429.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature*, 415(6868), 198-205.
- Beuckelmann, D. J., Nabauer, M., and Erdmann, E. (1993). "Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure." *Circ. Res.*, 73, 379-385.
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S. E., Akhter, S. A., and Schwartz, A. (2005). "The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on." *J. Clin. Invest.*, 115(12), 3306-3317.
- Boixel, C., Gavillet, B., Rougier, J. S., and Abriel, H. (2006). "Aldosterone increases voltage-gated sodium current in ventricular myocytes." *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, 290(6), H2257-H2266.
- Bowling, N., Walsh, R. A., Song, G., Estridge, T., Sandusky, G. E., Fouts, R. L., Mintze, K., Pickard, T., Roden, R., Bristow, M. R., Sabbah, H. N., Mizrahi, J. L., Gromo, G., King, G. L., and Vlahos, C. J. (1999). "Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart." *Circulation*, 99(3), 384-391.

- Braun, M. U., LaRosee, P., Schon, S., Borst, M. M., and Strasser, R. H. (2002). "Differential regulation of cardiac protein kinase C isozyme expression after aortic banding in rat." *Cardiovasc. Res.*, 56(1), 52-63.
- Brilla, C. G., Matsubara, L. S., and Weber, K. T. (1993). "Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 25(5), 563-575.
- Brilla, C. G., and Weber, K. T. (1992). "Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat." *Cardiovasc. Res.*, 26(7), 671-677.
- Brisinda, D., Meloni, A. M., and Fenici, R. (2004). "Contactless magnetocardiographic study of ventricular repolarization in intact Wistar rats: evidence of gender-related differences." *Basic Res. Cardiol.*, 99(3), 193-203.
- Casal, A. J., Silvestre, J. S., Delcayre, C., and Capponi, A. M. (2003). "Expression and modulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in rat cardiocytes and after myocardial infarction." *Endocrinology*, 144(5), 1861-1868.
- Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 16, 521-555.
- Chapman, N., Dobson, J., Wilson, S., Dahlof, B., Sever, P. S., Wedel, H., and Poulter, N. R. (2007). "Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension." *Hypertension*, 49(4), 839-845.
- Christ, M., Gunther, A., Heck, M., Schmidt, B. M., Falkenstein, E., and Wehling, M. (1999). "Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells." *Circulation*, 99(11), 1485-1491.

- Christ, M., Meyer, C., Sippel, K., and Wehling, M. (1995). "Rapid aldosterone signaling in vascular smooth muscle cells: involvement of phospholipase C, diacylglycerol and protein kinase C alpha." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 213(1), 123-129.
- Christ, M., and Wehling, M. (1998). "Cardiovascular steroid actions: swift swallows or sluggish snails?" *Cardiovasc. Res.*, 40(1), 34-44.
- Cittadini, A., Monti, M. G., Isgaard, J., Casaburi, C., Stromer, H., Di Gianni, A., Serpico, R., Saldamarco, L., Vanasia, M., and Sacca, L. (2003). "Aldosterone receptor blockade improves left ventricular remodeling and increases ventricular fibrillation threshold in experimental heart failure." *Cardiovasc. Res.*, 58(3), 555-564.
- Cook, C. S., Berry, L. M., and Burton, E. (2004). "Prediction of in vivo drug interactions with eplerenone in man from in vitro metabolic inhibition data." *Xenobiotica*, 34(3), 215-228.
- Cook, C. S., Berry, L. M., Kim, D. H., Burton, E. G., Hribar, J. D., and Zhang, L. (2002). "Involvement of CYP3A in the metabolism of eplerenone in humans and dogs: differential metabolism by CYP3A4 and CYP3A5." *Drug Metab Dispos.*, 30(12), 1344-1351.
- Croom, K. F., and Perry, C. M. (2005). "Eplerenone: a review of its use in essential hypertension." *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 5(1), 51-69.
- Davis, K. L., and Nappi, J. M. (2003). "The cardiovascular effects of eplerenone, a selective aldosterone-receptor antagonist." *Clin. Ther.*, 25(11), 2647-2668.
- de Gasparo, M., Joss, U., Ramjouw, H. P., Whitebread, S. E., Haenni, H., Schenkel, L., Kraehenbuehl, C., Biollaz, M., Grob, J., Schmidlin, J., and . (1987). "Three new

epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 240(2), 650-656.

Dhamoon, A. S., and Jalife, J. (2005). "The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis." *Heart Rhythm.*, 2(3), 316-324.

Ding, B., Price, R. L., Borg, T. K., Weinberg, E. O., Halloran, P. F., and Lorell, B. H. (1999). "Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin." *Circ. Res.*, 84(6), 729-734.

Domenighetti, A. A., Boixel, C., Cefai, D., Abriel, H., and Pedrazzini, T. (2007). "Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 42(1), 63-70.

Dorn, G. W., and Force, T. (2005). "Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy." *J. Clin. Invest.*, 115(3), 527-537.

Dorn, G. W., and Mochly-Rosen, D. (2002). "Intracellular transport mechanisms of signal transducers." *Annu. Rev. Physiol.*, 64, 407-429.

Duprez, D. A., Bauwens, F. R., De Buyzere, M. L., De Backer, T. L., Kaufman, J. M., Van Hoecke, J., Vermeulen, A., and Clement, D. L. (1993). "Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension." *Am. J. Cardiol.*, 71(3), 17A-20A.

Farquharson, C. A., and Struthers, A. D. (2002). "Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy." *Clin. Sci. (Lond)*, 103(4), 425-431.

- Fauconnier, J., Lacampagne, A., Rauzier, J. M., Vassort, G., and Richard, S. (2005). "Ca²⁺-dependent reduction of IK1 in rat ventricular cells: a novel paradigm for arrhythmia in heart failure?" *Cardiovasc. Res.*, 68(2), 204-212.
- Fukushima, K., Naito, H., Funayama, Y., Yonezawa, H., Haneda, S., Shibata, C., and Sasaki, I. (2004). "In vivo induction of prostasin mRNA in colonic epithelial cells by dietary sodium depletion and aldosterone infusion in rats." *J. Gastroenterol.*, 39(10), 940-947.
- Funder, J. W. (2005). "The nongenomic actions of aldosterone." *Endocr. Rev.*, 26(3), 313-321.
- Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R., and Smith, A. I. (1988). "Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated." *Science*, 242(4878), 583-585.
- Gardiner, S. M., March, J. E., Kemp, P. A., Mullins, J. J., and Bennett, T. (1995). "Haemodynamic effects of losartan and the endothelin antagonist, SB 209670, in conscious, transgenic ((mRen-2)²⁷), hypertensive rats." *Br. J. Pharmacol.*, 116, 2237-2244.
- Garwitz, E. T., and Jones, A. W. (1982). "Aldosterone infusion into the rat and dose-dependent changes in blood pressure and arterial ionic transport." *Hypertension*, 4(3), 374-381.
- Gekle, M., Silbernagl, S., and Oberleithner, H. (1997). "The mineralocorticoid aldosterone activates a proton conductance in cultured kidney cells." *Am. J. Physiol.*, 273(5 Pt 1), C1673-C1678.
- Gomez-Sanchez, E. P., Ahmad, N., Romero, D. G., and Gomez-Sanchez, C. E. (2004). "Origin of aldosterone in the rat heart." *Endocrinology*, 145(11), 4796-4802.

Gong, N., Bodi, I., Zobel, C., Schwartz, A., Molkentin, J. D., and Backx, P. H. (2006).

"Calcineurin increases cardiac transient outward K⁺ currents via transcriptional up-regulation of Kv4.2 channel subunits." *J. Biol. Chem.*, 281(50), 38498-38506.

Harvey, B. J., Doolan, C. M., Condliffe, S. B., Renard, C., Alzamora, R., and Urbach, V.

(2002). "Non-genomic convergent and divergent signalling of rapid responses to aldosterone and estradiol in mammalian colon." *Steroids*, 67(6), 483-491.

Hayashi, M., Tsutamoto, T., Wada, A., Maeda, K., Mabuchi, N., Tsutsui, T., Horie, H.,

Ohnishi, M., and Kinoshita, M. (2001). "Intravenous atrial natriuretic peptide prevents left ventricular remodeling in patients with first anterior acute myocardial infarction." *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37(7), 1820-1826.

Hayashi, Y., Ohtani, M., Hiraishi, T., Kobayashi, Y., and Nakamura, T. (2003). "Synthetic

human alpha-atrial natriuretic peptide infusion in management after open heart operations." *ASAIO J.*, 49(3), 320-324.

Henry, P., Pearson, W. L., and Nichols, C. G. (1996). "Protein kinase C inhibition of cloned

inward rectifier (HRK1/KIR2.3) K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes." *J. Physiol*, 495 (Pt 3), 681-688.

Hill, J. A., Karimi, M., Kutschke, W., Davisson, R. L., Zimmerman, K., Wang, Z., Kerber, R.

E., and Weiss, R. M. (2000). "Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload." *Circulation*, 101(24), 2863-2869.

Hullin, R., Asmus, F., Ludwig, A., Hersel, J., and Boekstegers, P. (1999). "Subunit expression

of the cardiac L-type calcium channel is differentially regulated in diastolic heart failure of the cardiac allograft." *Circulation*, 100(2), 155-163.

- Iglarz, M., Touyz, R. M., Viel, E. C., Amiri, F., and Schiffrin, E. L. (2004). "Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotension system." *Am. J. Hypertens.*, 17(7), 597-603.
- Ito, T., Yoshimura, M., Nakamura, S., Nakayama, M., Shimasaki, Y., Harada, E., Mizuno, Y., Yamamuro, M., Harada, M., Saito, Y., Nakao, K., Kurihara, H., Yasue, H., and Ogawa, H. (2003). "Inhibitory effect of natriuretic peptides on aldosterone synthase gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes." *Circulation*, 107(6), 807-810.
- Jaffe, I. Z., and Mendelsohn, M. E. (2005). "Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells." *Circ. Res.*, 96(6), 643-650.
- Jeunemaitre, X., Chatellier, G., Kreft-Jais, C., Charru, A., DeVries, C., Plouin, P. F., Corvol, P., and Menard, J. (1987). "Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension." *Am. J. Cardiol.*, 60(10), 820-825.
- Kaab, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., Steinbeck, G., McKinnon, D., and Tomaselli, G. F. (1998b). "Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density." *Circulation*, 98(14), 1383-1393.
- Kaab, S., Dixon, J., Duc, J., Ashen, D., Nabauer, M., Beuckelmann, D. J., Steinbeck, G., McKinnon, D., and Tomaselli, G. F. (1998a). "Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density." *Circulation*, 98, 1383-1393.
- Kamp, T. J., and Hell, J. W. (2000). "Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C." *Circ. Res.*, 87(12), 1095-1102.

- Kannel, W. B. (1991). "Left ventricular hypertrophy as a risk factor: the Framingham experience." *J. Hypertens. Suppl.*, 9, S3-8; discussion S8-9.
- Kannel, W. B. (1983). "Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy." *Am. J. Med.*, 75(3A), 4-11.
- Karle, C. A., Zitron, E., Zhang, W., Wendt-Nordahl, G., Kathofer, S., Thomas, D., Gut, B., Scholz, E., Vahl, C. F., Katus, H. A., and Kiehn, J. (2002). "Human cardiac inwardly-rectifying K⁺ channel Kir(2.1b) is inhibited by direct protein kinase C-dependent regulation in human isolated cardiomyocytes and in an expression system." *Circulation*, 106(12), 1493-1499.
- Kayes-Wandover, K. M., and White, P. C. (2000). "Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart." *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(7), 2519-2525.
- Klein, G., Schaefer, A., Hilfiker-Kleiner, D., Oppermann, D., Shukla, P., Quint, A., Podewski, E., Hilfiker, A., Schroder, F., Leitges, M., and Drexler, H. (2005). "Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKCepsilon." *Circ. Res.*, 96(7), 748-755.
- Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C. G., Seino, S., and Vandenberg, C. A. (2005). "International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels." *Pharmacol. Rev.*, 57(4), 509-526.
- Kurokawa, J., and Abriel, H. (2009). "Neurohormonal regulation of cardiac ion channels in chronic heart failure." *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 54(2), 98-105.

- Levin, E. R., Gardner, D. G., and Samson, W. K. (1998). "Natriuretic peptides." *N. Engl. J. Med.*, 339(5), 321-328.
- Li, J., McLerie, M., and Lopatin, A. N. (2004). "Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability." *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 287(6), H2790-H2802.
- Liu, G. X., Derst, C., Schlichthorl, G., Heinen, S., Seebohm, G., Bruggemann, A., Kummer, W., Veh, R. W., Daut, J., and Preisig-Muller, R. (2001). "Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes." *J. Physiol.*, 532(Pt 1), 115-126.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method." *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lombes, M., Alfaidy, N., Eugene, E., Lessana, A., Farman, N., and Bonvalet, J. P. (1995). "Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart." *Circulation*, 92(2), 175-182.
- Lombes, M., Farman, N., Bonvalet, J. P., and Zennaro, M. C. (2000). "Identification and role of aldosterone receptors in the cardiovascular system." *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 61(1), 41-46.
- Lombes, M., Kenouch, S., Souque, A., Farman, N., and Rafestin-Oblin, M. E. (1994). "The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase." *Endocrinology*, 135(3), 834-840.

- London, B., Jeron, A., Zhou, J., Buckett, P., Han, X., Mitchell, G. F., and Koren, G. (1998). "Long QT and ventricular arrhythmias in transgenic mice expressing the N terminus and first transmembrane segment of a voltage-gated potassium channel." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(6), 2926-2931.
- Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005). "Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling." *Science*, 309(5736), 903-908.
- MacFadyen, R. J., Barr, C. S., and Struthers, A. D. (1997). "Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients." *Cardiovasc. Res.*, 35(1), 30-34.
- Magliola, L., McMahon, E. G., and Jones, A. W. (1986). "Alterations in active Na-K transport during mineralocorticoid-salt hypertension in the rat." *Am. J. Physiol.*, 250(4 Pt 1), C540-C546.
- Malhotra, A., Kang, B. P., Opawumi, D., Belizaire, W., and Meggs, L. G. (2001). "Molecular biology of protein kinase C signaling in cardiac myocytes." *Mol. Cell Biochem.*, 225(1-), 97-107.
- Mano, A., Tatsumi, T., Shiraishi, J., Keira, N., Nomura, T., Takeda, M., Nishikawa, S., Yamanaka, S., Matoba, S., Kobara, M., Tanaka, H., Shirayama, T., Takamatsu, T., Nozawa, Y., and Matsubara, H. (2004). "Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways." *Circulation*, 110(3), 317-323.
- Matsubara, H., Suzuki, J., and Inada, M. (1993). "Shaker-related potassium channel, Kv1.4, mRNA regulation in cultured rat heart myocytes and differential expression of Kv1.4 and Kv1.5 genes in myocardial development and hypertrophy." *J. Clin. Invest.*, 92, 1659-1666.

- Mayr, M., Chung, Y. L., Mayr, U., McGregor, E., Troy, H., Baier, G., Leitges, M., Dunn, M. J., Griffiths, J. R., and Xu, Q. (2004). "Loss of PKC-delta alters cardiac metabolism." *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 287(2), H937-H945.
- Mazak, I., Fiebeler, A., Muller, D. N., Park, J. K., Shagdarsuren, E., Lindschau, C., Dechend, R., Viedt, C., Pilz, B., Haller, H., and Luft, F. C. (2004). "Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells." *Circulation*, 109(22), 2792-2800.
- McLerie, M., and Lopatin, A. N. (2003). "Dominant-negative suppression of I(K1) in the mouse heart leads to altered cardiac excitability." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 35(4), 367-378.
- Miake, J., Marban, E., and Nuss, H. B. (2003). "Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression." *J. Clin. Invest*, 111(10), 1529-1536.
- Mihailidou, A. S., Mardini, M., and Funder, J. W. (2004). "Rapid, nongenomic effects of aldosterone in the heart mediated by epsilon protein kinase C." *Endocrinology*, 145(2), 773-780.
- Milliez, P., Girerd, X., Plouin, P. F., Blacher, J., Safar, M. E., and Mourad, J. J. (2005). "Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism." *J. Am. Coll. Cardiol.*, 45(8), 1243-1248.
- Miyamoto, A., Nakayama, K., Imaki, H., Hirose, S., Jiang, Y., Abe, M., Tsukiyama, T., Nagahama, H., Ohno, S., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. I. (2002). "Increased proliferation of B cells and auto-immunity in mice lacking protein kinase Cdelta." *Nature*, 416(6883), 865-869.

- Mizuno, Y., Yoshimura, M., Yasue, H., Sakamoto, T., Ogawa, H., Kugiyama, K., Harada, E., Nakayama, M., Nakamura, S., Ito, T., Shimasaki, Y., Saito, Y., and Nakao, K. (2001). "Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans." *Circulation*, 103(1), 72-77.
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., and Olson, E. N. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." *Cell*, 93, 215-228.
- Nagata, K., Obata, K., Xu, J., Ichihara, S., Noda, A., Kimata, H., Kato, T., Izawa, H., Murohara, T., and Yokota, M. (2006). "Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats." *Hypertension*, 47(4), 656-664.
- Naruse, K., and King, G. L. (2000). "Protein kinase C and myocardial biology and function." *Circ. Res.*, 86(11), 1104-1106.
- Nattel, S. (2002). "New ideas about atrial fibrillation 50 years on." *Nature*, 415(6868), 219-226.
- Nerbonne, J. M. (2000). "Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium." *J. Physiol.*, 525, 285-298.
- Okoshi, M. P., Yan, X., Okoshi, K., Nakayama, M., Schuldt, A. J., O'Connell, T. D., Simpson, P. C., and Lorell, B. H. (2004). "Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy." *J. Card Fail.*, 10(6), 511-518.
- Oudit, G. Y., Kassiri, Z., Sah, R., Ramirez, R. J., Zobel, C., and Backx, P. H. (2001). "The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (i_{to}) in normal and diseased myocardium." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33(5), 851-872.

- Ouvrard-Pascaud, A., Sainte-Marie, Y., Benitah, J. P., Perrier, R., Soukaseum, C., Cat, A. N., Royer, A., Le Quang, K., Charpentier, F., Demolombe, S., Mechta-Grigoriou, F., Beggah, A. T., Maison-Blanche, P., Oblin, M. E., Delcayre, C., Fishman, G. I., Farman, N., Escoubet, B., and Jaisser, F. (2005). "Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias." *Circulation*, 111(23), 3025-3033.
- Perrier, R., Richard, S., Sainte-Marie, Y., Rossier, B. C., Jaisser, F., Hummler, E., and Benitah, J. P. (2005). "A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac L-type Ca²⁺ current in mice." *J. Physiol*, 569(Pt 1), 153-162.
- Pinto, J. M., and Boyden, P. A. (1999). "Electrical remodeling in ischemia and infarction." *Cardiovasc. Res.*, 42(2), 284-297.
- Pitt, B., Reichek, N., Willenbrock, R., Zannad, F., Phillips, R. A., Roniker, B., Kleiman, J., Krause, S., Burns, D., and Williams, G. H. (2003a). "Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study." *Circulation*, 108(15), 1831-1838.
- Pitt, B., Remme, W., Zannad, F., Neaton, J., Martinez, F., Roniker, B., Bittman, R., Hurley, S., Kleiman, J., and Gatlin, M. (2003b). "Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction." *N. Engl. J. Med.*, 348(14), 1309-1321.
- Pitt, B., Zannad, F., Remme, W. J., Cody, R., Castaigne, A., Perez, A., Palensky, J., and Wittes, J. (1999). "The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators." *N. Engl. J. Med.*, 341(10), 709-717.

Pogwizd, S. M., Schlotthauer, K., Li, L., Yuan, W., and Bers, D. M. (2001).

"Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness." *Circ Res*, 88(11), 1159-1167.

Puceat, M., Hilal-Dandan, R., Strulovici, B., Brunton, L. L., and Brown, J. H. (1994).

"Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes." *J. Biol. Chem.*, 269(24), 16938-16944.

Ramires, F. J., Mansur, A., Coelho, O., Maranhao, M., Gruppi, C. J., Mady, C., and Ramires,

J. A. (2000). "Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy." *Am. J. Cardiol.*, 85(10), 1207-1211.

Ravens, U., and Cerbai, E. (2008). "Role of potassium currents in cardiac arrhythmias."

Europace., 10(10), 1133-1137.

Robert, V., Silvestre, J. S., Charlemagne, D., Sabri, A., Trouve, P., Wassef, M.,

Swynghedauw, B., and Delcayre, C. (1995). "Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats." *Hypertension*, 26, 971-978.

Rocha, R., Rudolph, A. E., Friedrich, G. E., Nachowiak, D. A., Kekec, B. K., Blomme, E. A.,

McMahon, E. G., and Delyani, J. A. (2002). "Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart." *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 283(5), H1802-H1810.

Romagni, P., Rossi, F., Guerrini, L., Quirini, C., and Santiemma, V. (2003). "Aldosterone

induces contraction of the resistance arteries in man." *Atherosclerosis*, 166(2), 345-349.

- Rozanski, G. J., Xu, Z., Whitney, R. T., Murakami, H., and Zucker, I. H. (1997). "Electrophysiology of rabbit ventricular myocytes following sustained rapid ventricular pacing." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 29(2), 721-732.
- Ruskoaho, H. (2003). "Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure." *Endocr. Rev.*, 24(3), 341-356.
- Sabri, A., and Steinberg, S. F. (2003). "Protein kinase C isoform-selective signals that lead to cardiac hypertrophy and the progression of heart failure." *Mol. Cell Biochem.*, 251(1-2), 97-101.
- Sah, R., Oudit, G. Y., Nguyen, T. T., Lim, H. W., Wickenden, A. D., Wilson, G. J., Molkenin, J. D., and Backx, P. H. (2002). "Inhibition of calcineurin and sarcolemmal Ca²⁺ influx protects cardiac morphology and ventricular function in K(v)4.2N transgenic mice." *Circulation*, 105(15), 1850-1856.
- Sato, A., Liu, J. P., and Funder, J. W. (1997). "Aldosterone rapidly represses protein kinase C activity in neonatal rat cardiomyocytes in vitro." *Endocrinology*, 138(8), 3410-3416.
- Sato, R., and Koumi, S. (1995). "Modulation of the inwardly rectifying K⁺ channel in isolated human atrial myocytes by alpha 1-adrenergic stimulation." *J. Membr. Biol.*, 148(2), 185-191.
- Schouten, E. G., Dekker, J. M., Meppelink, P., Kok, F. J., Vandenbroucke, J. P., and Pool, J. (1991). "QT interval prolongation predicts cardiovascular mortality in an apparently healthy population." *Circulation*, 84(4), 1516-1523.
- Schram, G., Pourrier, M., Wang, Z., White, M., and Nattel, S. (2003). "Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents." *Cardiovasc. Res.*, 59(2), 328-338.

- Schulz-Baldes, A., Berger, S., Grahammer, F., Warth, R., Goldschmidt, I., Peters, J., Schutz, G., Greger, R., and Bleich, M. (2001). "Induction of the epithelial Na⁺ channel via glucocorticoids in mineralocorticoid receptor knockout mice." *Pflugers Arch.*, 443(2), 297-305.
- Seisenberger, C., Specht, V., Welling, A., Platzer, J., Pfeifer, A., Kuhbandner, S., Striessnig, J., Klugbauer, N., Feil, R., and Hofmann, F. (2000). "Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type alpha1C (Cav1.2) calcium channel gene in the mouse." *J. Biol. Chem.*, 275(50), 39193-39199.
- Shieh, C. C., Coghlan, M., Sullivan, J. P., and Gopalakrishnan, M. (2000). "Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities." *Pharmacol. Rev.*, 52(4), 557-594.
- Sica, D. A. (2005). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mineralocorticoid blocking agents and their effects on potassium homeostasis." *Heart Fail. Rev.*, 10(1), 23-29.
- Silvestre, J. S., Heymes, C., Oubenaissa, A., Robert, V., Aupetit-Faisant, B., Carayon, A., Swynghedauw, B., and Delcayre, C. (1999). "Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis." *Circulation*, 99(20), 2694-2701.
- Silvestre, J. S., Robert, V., Heymes, C., Aupetit-Faisant, B., Mouas, C., Moalic, J. M., Swynghedauw, B., and Delcayre, C. (1998). "Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation." *J. Biol. Chem.*, 273(9), 4883-4891.
- Smith, J. M., and Jones, A. W. (1990). "Calcium antagonists inhibit elevated potassium efflux from aorta of aldosterone-salt hypertensive rats." *Hypertension*, 15(1), 78-83.

- Staessen, J., Lijnen, P., Fagard, R., Verschueren, L. J., and Amery, A. (1981). "Rise in plasma concentration of aldosterone during long-term angiotensin II suppression." *J. Endocrinol.*, 91(3), 457-465.
- Sternon, J. (1990). "Spironolactone and altizide in systemic hypertension: ambulatory multicenter study." *Am. J. Cardiol.*, 65(23), 24K-27K.
- Stier, C. T., Jr. (2003). "Eplerenone: a selective aldosterone blocker." *Cardiovasc. Drug Rev.*, 21(3), 169-184.
- Struthers, A. D. (1995). "Aldosterone escape during ACE inhibitor therapy in chronic heart failure." *Eur. Heart J.*, 16 Suppl N, 103-106.
- Sun, Y., Zhang, J., Lu, L., Chen, S. S., Quinn, M. T., and Weber, K. T. (2002). "Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress." *Am. J. Pathol.*, 161(5), 1773-1781.
- Takamura, N., Maruyama, T., Ahmed, S., Suenaga, A., and Otagiri, M. (1997). "Interactions of aldosterone antagonist diuretics with human serum proteins." *Pharm. Res.*, 14(4), 522-526.
- Takeda, Y., Yoneda, T., Demura, M., Usukura, M., and Mabuchi, H. (2002a). "Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy." *Circulation*, 105(6), 677-679.
- Takeda, Y., Yoneda, T., Demura, M., Usukura, M., and Mabuchi, H. (2002b). "Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy." *Circulation*, 105(6), 677-679.

- Takeishi, Y., Ping, P., Bolli, R., Kirkpatrick, D. L., Hoit, B. D., and Walsh, R. A. (2000). "Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C epsilon causes concentric cardiac hypertrophy." *Circ. Res.*, 86(12), 1218-1223.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). "Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle." *Nature*, 328(6128), 313-318.
- Tandan, S., Wang, Y., Wang, T. T., Jiang, N., Hall, D. D., Hell, J. W., Luo, X., Rothermel, B. A., and Hill, J. A. (2009). "Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type Ca²⁺ channel." *Circ. Res.*, 105(1), 51-60.
- Tomaselli, G. F., Beuckelmann, D. J., Calkins, H. G., Berger, R. D., Kessler, P. D., Lawrence, J. H., Kass, D., Feldman, A. M., and Marban, E. (1994). "Sudden cardiac death in heart failure. The role of abnormal repolarization." *Circulation*, 90(5), 2534-2539.
- Tomaselli, G. F., and Marban, E. (1999). "Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure." *Cardiovasc. Res.*, 42(2), 270-283.
- Tsuji, Y., Opthof, T., Kamiya, K., Yasui, K., Liu, W., Lu, Z., and Kodama, I. (2000). "Pacing-induced heart failure causes a reduction of delayed rectifier potassium currents along with decreases in calcium and transient outward currents in rabbit ventricle." *Cardiovasc. Res.*, 48(2), 300-309.
- Tsybouleva, N., Zhang, L., Chen, S., Patel, R., Lutucuta, S., Nemoto, S., DeFreitas, G., Entman, M., Carabello, B. A., Roberts, R., and Marian, A. J. (2004). "Aldosterone, Through Novel Signaling Proteins, Is a Fundamental Molecular Bridge Between the Genetic Defect and the Cardiac Phenotype of Hypertrophic Cardiomyopathy." *Circulation*, 109(10), 1284-1291.

- Walker, M. J., Curtis, M. J., Hearse, D. J., Campbell, R. W., Janse, M. J., Yellon, D. M., Cobbe, S. M., Coker, S. J., Harness, J. B., Harron, D. W., and . (1988). "The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion." *Cardiovasc. Res.*, 22(7), 447-455.
- Wang, H., Yang, B., Zhang, Y., Han, H., Wang, J., Shi, H., and Wang, Z. (2001a). "Different subtypes of alpha1-adrenoceptor modulate different K⁺ currents via different signaling pathways in canine ventricular myocytes." *J. Biol. Chem.*, 276(44), 40811-40816.
- Wang, J., Liu, X., Arneja, A. S., and Dhalla, N. S. (1999a). "Alterations in protein kinase A and protein kinase C levels in heart failure due to genetic cardiomyopathy." *Can. J. Cardiol.*, 15(6), 683-690.
- Wang, J., Liu, X., Sentex, E., Takeda, N., and Dhalla, N. S. (2003). "Increased expression of protein kinase C isoforms in heart failure due to myocardial infarction." *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 284(6), H2277-H2287.
- Wang, Y., Cheng, J., Tandan, S., Jiang, M., McCloskey, D. T., and Hill, J. A. (2006). "Transient-outward K⁺ channel inhibition facilitates L-type Ca²⁺ current in heart." *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 17(3), 298-304.
- Wang, Z., Feng, J., Shi, H., Pond, A., Nerbonne, J. M., and Nattel, S. (1999b). "Potential molecular basis of different physiological properties of the transient outward K⁺ current in rabbit and human atrial myocytes [see comments]." *Circ. Res.*, 84, 551-561.
- Wang, Z., Kutschke, W., Richardson, K. E., Karimi, M., and Hill, J. A. (2001b). "Electrical remodeling in pressure-overload cardiac hypertrophy: role of calcineurin." *Circulation*, 104(14), 1657-1663.

- Weber, K. T. (2001). "Aldosterone in congestive heart failure." *N. Engl. J. Med.*, 345(23), 1689-1697.
- Wehling, M. (1997). "Specific, nongenomic actions of steroid hormones." *Annu. Rev. Physiol.*, 59, 365-393.
- Wehling, M., Ulsenheimer, A., Schneider, M., Neylon, C., and Christ, M. (1994). "Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204(2), 475-481.
- Wei, C. M., Heublein, D. M., Perrella, M. A., Lerman, A., Rodeheffer, R. J., McGregor, C. G., Edwards, W. D., Schaff, H. V., and Burnett, J. C., Jr. (1993). "Natriuretic peptide system in human heart failure." *Circulation*, 88(3), 1004-1009.
- White, W. B., Duprez, D., St Hillaire, R., Krause, S., Roniker, B., Kuse-Hamilton, J., and Weber, M. A. (2003). "Effects of the selective aldosterone blocker eplerenone versus the calcium antagonist amlodipine in systolic hypertension." *Hypertension*, 41(5), 1021-1026.
- Will, P. C., Cortright, R. N., and Hopfer, U. (1980). "Polyethylene glycols as solvents in implantable osmotic pumps." *J. Pharm. Sci.*, 69(6), 747-749.
- Yamamoto, N., Yasue, H., Mizuno, Y., Yoshimura, M., Fujii, H., Nakayama, M., Harada, E., Nakamura, S., Ito, T., and Ogawa, H. (2002). "Aldosterone is produced from ventricles in patients with essential hypertension." *Hypertension*, 39(5), 958-962.
- Yamashita, T., Murakawa, Y., Hayami, N., Fukui, E., Kasaoka, Y., Inoue, M., and Omata, M. (2000). "Short-term effects of rapid pacing on mRNA level of voltage-dependent K(+)

channels in rat atrium: electrical remodeling in paroxysmal atrial tachycardia."

Circulation, 101(16), 2007-2014.

Yang, S. N., and Berggren, P. O. (2005). "Beta-cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology." *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab*, 288(1), E16-E28.

Yatani, A., Honda, R., Tymitz, K. M., Lalli, J. M., and Molkenin, J. D. (2001). "Enhanced Ca(2+)Channel Currents in Cardiac Hypertrophy Induced by Activation of Calcineurin-dependent Pathway." *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33(2), 249-259.

Yee, K. M., Pringle, S. D., and Struthers, A. D. (2001). "Circadian variation in the effects of aldosterone blockade on heart rate variability and QT dispersion in congestive heart failure." *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37(7), 1800-1807.

Yoshida, K., Kim-Mitsuyama, S., Wake, R., Izumiya, Y., Izumi, Y., Yukimura, T., Ueda, M., Yoshiyama, M., and Iwao, H. (2005). "Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress." *Hypertens. Res.*, 28(5), 447-455.

Yue, L., Feng, J., Wang, Z., and Nattel, S. (1999). "Adrenergic control of the ultrarapid delayed rectifier current in canine atrial myocytes." *J. Physiol*, 516 (Pt 2), 385-398.

Zabel, M., Portnoy, S., and Franz, M. R. (1995). "Electrocardiographic indexes of dispersion of ventricular repolarization: an isolated heart validation study." *J. Am. Coll. Cardiol.*, 25(3), 746-752.

Zaritsky, J., Redell, J., Tempel, B., and Schwarz, T. (2001). "The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K(+) current (I(K1)) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes." *J. Physiol.*, 533(Pt 3), 697-710.

Zaritsky, J. J., Eckman, D. M., Wellman, G. C., Nelson, M. T., and Schwarz, T. L. (2000).

"Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K(+) current in K(+)-mediated vasodilation [see comments]."

Circ. Res. 2000. Jul. 21. ;87. (2.):160. -6., 87(2), 160-166.

Zhang, J., Sato, M., Duzic, E., Kubalak, S. W., Lanier, S. M., and Webb, J. G. (1997).

"Adenylyl cyclase isoforms and vasopressin enhancement of agonist-stimulated cAMP in vascular smooth muscle cells." *Am. J. Physiol*, 273(2 Pt 2), H971-H980.

Zhu, G., Qu, Z., Cui, N., and Jiang, C. (1999). "Suppression of Kir2.3 activity by protein

kinase C phosphorylation of the channel protein at threonine 53." *J. Biol. Chem.*, 274(17), 11643-11646.

Zillich, A. J., and Carter, B. L. (2002). "Eplerenone--a novel selective aldosterone blocker."

Ann. Pharmacother., 36(10), 1567-1576.

Zobel, C., Cho, H. C., Nguyen, T. T., Pekhletski, R., Diaz, R. J., Wilson, G. J., and Backx, P.

H. (2003). "Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2." *J.*

Physiol, 550(Pt 2), 365-372.

Publikationen

Paper

Ladage D, Schützeberg N, Dartsch T, Krausgrill B, Halbach M, Zobel C, Müller-Ehmsen J:
Hyperaldosteronism is associated with a decrease in number and altered growth factor
expression of endothelial progenitor cells in rats.
Int J Cardiol. **2010 Jan 28.** [Epub ahead of print]

Dartsch T, Fischer R, Gapelyuk A, Weiergräber M, Ladage D, Schneider T, Schirdewan A,
Müller-Ehmsen J, Zobel C:
Long-term aldosterone treatment induces cardiac hypertrophy and electrical
remodeling independent of hypertension.
2010 submitted

Poster

Patel C, Nguyen N, Dartsch T, Terrell J, Hughes J:
Inhibition of BVD virus replication by cellular delivery of UT 231-B and Amantadine
using cationic liposomes.
19th Annual Research Showcase and Awards Recognition Day, College of Pharmacy,
University of Florida, Gainesville, USA **2006**

Dartsch T, Fischer R, Gapelyuk A, Weiergräber M, Ladage D, Schneider T, Schirdewan A,
Müller-Ehmsen J, Zobel C:
Aldosterone induced electrical remodeling and blockade of the mineralocorticoid
receptor in vivo
DPHG Jahrestagung **2009**, Jena, Poster D01

Vorträge

Dartsch T, Fischer R, Gapelyuk A, Weiergräber M, Ladage D, Reuter H, Frank K, Schneider
T, Schirdewan A, Müller-Ehmsen J, Zobel C:
Aldosteron-induziertes elektrisches Remodeling und spezifische (Eplerenon) versus
unspezifische (Spironolacton) Blockade des Mineralkortikoidrezeptors in vivo.
74. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie **2008**, Mannheim, Vortrag
KN1717

Dartsch T, Fischer R, Gapelyuk A, Weiergräber M, Ladage D, Reuter H, Frank K, Schneider
T, Schirdewan A, Müller-Ehmsen J, Zobel C:
Aldosterone-induced electrical remodeling and specific (eplerenone) versus unspecific
(spironolactone) blockade of the mineralocorticoid receptor in vivo.
ESC Kongress (European Society of Cardiology) **2008**, München, Vortrag 3128

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den

Theresa Dartsch

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Auswirkungen von Aldosteron auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den

Theresa Dartsch